(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2007-517058
(P2007-517058A)
(43)公表日　平成19年6月28日(2007.6.28)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
A61K 45/00	(2006.01)	A61K	45/00	ZNA	4B024
C12Q 1/02	(2006.01)	C12Q	1/02		4B063
C12Q 1/68	(2006.01)	C12Q	1/68	A	4C084
A61P 35/00	(2006.01)	A61P	35/00		4C086
A61K 33/24	(2006.01)	A61K	33/24		4C206

審査請求 有　予備審査請求 未請求　（全 94 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2006-547537 (P2006-547537)
(86)(22)出願日　平成16年12月30日 (2004.12.30)
(85)翻訳文提出日　平成18年6月30日 (2006.6.30)
(86)国際出願番号　PCT/US2004/043837
(87)国際公開番号　WO2005/066371
(87)国際公開日　平成17年7月21日 (2005.7.21)
(31)優先権主張番号　60/533,505
(32)優先日　平成15年12月31日 (2003.12.31)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　500273296
ザ・ペン・ステート・リサーチ・ファンデーション
アメリカ合衆国ペンシルバニア州１６８０２，ユニバーシティ・パーク，オールド・メイン　３０４
(74)代理人　100068755
弁理士　恩田　博宣
(74)代理人　100105957
弁理士　恩田　誠
(72)発明者　アル－マーラニ、セイマー
アメリカ合衆国　６６６１４　カンザス州　トピーカ　エスダブリュ　ラギート　コート　２５１３

最終頁に続く

(54)【発明の名称】卵巣がんの化学療法に対する抵抗性を予測および克服するための方法ならびに結腸がんの発生を予測するための方法

(57)【要約】
本発明は、卵巣がん患者の腫瘍が化学療法に対して抵抗性であるかどうかを予測するための方法を提供する。本発明はまた、卵巣がんの治療を受ける患者における、治療、特に化学療法的治療の有効性を観察するための方法も提供する。本発明はさらに、卵巣がん細胞の化学療法薬抵抗性を低減させることによって卵巣がんを治療するための方法も提供する。さらに、本発明は、従来の化学療法的治療計画に対して抵抗性である腫瘍細胞における腫瘍細胞増殖阻害因子を同定するために化合物をスクリーニングする方法も提供する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
腫瘍細胞の化学療法薬抵抗性を低減させる方法であって、腫瘍細胞を細胞遺伝子の少なくとも１種の修飾因子に接触させる工程からなり、該細胞遺伝子が、Ｓ１００Ａ１０、Ｓ１００Ａ１１、カルパイン２、ＳＰＡＲＣ、ＭｅｔＡＰ２、ＫＬＫ６、ＡＲＡ９、カルポニン２、ＲＮＰＳ１、ｅＩＦ５、ｅＩＦ２Ｂε、ＨＳＦ２、ＷＤＲ１、フューズドトウ（Ｆｕｓｅｄ　ｔｏｅｓ）、ＮＭ２３Ｄ、ＡＤＡＲ１、グランカルシン、ＮＢＲ１、ＳＡＰＫ／Ｅｒｋ１、亜鉛フィンガータンパク質－２６２ＭＹＭ、ＨＹＡ２２、ＭＲＰＬ４、ビネキシンβ、Ｇ－ＣＳＦＲ、ＩＧＦＢＰ－７、ＦＡＳＴキナーゼ、ＴＥＳＫ２、ＳＲＢ１、ＫＩＡＡ００８２、ＭＰＰ１０、ＨＭＴ１、ＮＡＩＰ、ｅＥＦ１ε、ＲＡＢ２２Ａ、ＮＣＯＲ２、またはＭＴ１であり、該細胞が、修飾因子の不在下と比べて、修飾因子の存在下で化学療法薬に対する抵抗性がより低いことを特徴とする方法。
【請求項２】
前記化学療法薬がシスプラチンである、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記修飾因子が阻害因子であり、前記遺伝子がＭｅｔＡＰ－２である、請求項１に記載の方法。
【請求項４】
前記阻害因子がｓｉＲＮＡである、請求項３に記載の方法。
【請求項５】
前記ｓｉＲＮＡが配列番号４、配列番号５、または配列番号６のものである、請求項４に記載の方法。
【請求項６】
前記阻害因子がフマギリンまたはフマギリンの誘導体である、請求項３に記載の方法。
【請求項７】
前記腫瘍細胞が卵巣がん腫瘍細胞である、請求項１に記載の方法。
【請求項８】
前記修飾因子が阻害因子であり、前記遺伝子がＳＰＡＲＣである、請求項１に記載の方法。
【請求項９】
前記阻害因子がｓｉＲＮＡである、請求項８に記載の方法。
【請求項１０】
前記ｓｉＲＮＡが配列番号１、配列番号２、または配列番号３のものである、請求項９に記載の方法。
【請求項１１】
前記修飾因子が阻害因子であり、前記遺伝子がカルパイン２である、請求項１に記載の方法。
【請求項１２】
前記阻害因子がＡＬＬＮまたはＡＬＬＮの誘導体である、請求項１１に記載の方法。
【請求項１３】
前記阻害因子がｓｉＲＮＡである、請求項１１に記載の方法。
【請求項１４】
前記ｓｉＲＮＡが配列番号７、配列番号８、または配列番号９のものである、請求項１３に記載の方法。
【請求項１５】
前記修飾因子が阻害因子であり、前記遺伝子がＳ１００Ａ１１である、請求項１に記載の方法。
【請求項１６】
前記阻害因子がｓｉＲＮＡである、請求項１５に記載の方法。
【請求項１７】

前記ｓｉＲＮＡが配列番号１０、配列番号１１、または配列番号１２のものである、請求項１６に記載の方法。
【請求項１８】
前記修飾因子が阻害因子であり、前記遺伝子がＳ１００Ａ１０である、請求項１に記載の方法。
【請求項１９】
前記阻害因子がｓｉＲＮＡである、請求項１８に記載の方法。
【請求項２０】
前記ｓｉＲＮＡが配列番号５９、配列番号６０、または配列番号６１のものである、請求項１９に記載の方法。
【請求項２１】
前記調節因子が阻害因子であり、前記遺伝子が、ＫＬＫ６、ＡＲＡ９、カルポニン２、ＲＮＰＳ１、ｅＩＦ５、ｅＩＦ２Ｂε、ＷＤＲ１、フューズドトウ（Ｆｕｓｅｄ　ｔｏｅｓ）、ＮＭ２３Ｄ、グランカルシン、ＳＡＰＫ／Ｅｒｋ１、亜鉛フィンガータンパク質－２６２ＭＹＭ、ＨＹＡ２２、ビネキシンβ、Ｇ－ＣＳＦＲ、ＩＧＦＢＰ－７、ＳＲＢ１、またはＫＩＡＡ００８２である、請求項１に記載の方法。
【請求項２２】
前記阻害因子がｓｉＲＮＡである、請求項２１に記載の方法。
【請求項２３】
前記ｓｉＲＮＡが配列番号６４～１０８、または１３４～１４４のうちの任意のものである、請求項２２に記載の方法。
【請求項２４】
腫瘍細胞の増殖を抑制する方法であって、腫瘍細胞を、１または複数の化学療法剤および細胞遺伝子の少なくとも１種の阻害因子の組合せに接触させる工程からなり、該細胞遺伝子が、ＳＰＡＲＣ、カルパイン２、Ｓ１００Ａ１０、Ｓ１００Ａ１１、ＭｅｔＡＰ２、ＫＬＫ６、ＡＲＡ９、カルポニン２、ＲＮＰＳ１、ｅＩＦ５、ｅＩＦ２Ｂε、ＷＤＲ１、フューズドトウ（Ｆｕｓｅｄ　ｔｏｅｓ）、ＮＭ２３Ｄ、グランカルシン、ＳＡＰＫ／Ｅｒｋ１、亜鉛フィンガータンパク質－２６２ＭＹＭ、ＨＹＡ２２、ビネキシンβ、Ｇ－ＣＳＦＲ、ＩＧＦＢＰ－７、ＳＲＢ１、またはＫＩＡＡ００８２であることを特徴とする方法。
【請求項２５】
前記化学療法剤がプラチナ系である、請求項２４に記載の方法。
【請求項２６】
前記少なくとも１種の阻害因子がＭｅｔＡＰ－２活性の阻害因子である、請求項２４に記載の方法。
【請求項２７】
前記少なくとも１種の阻害因子がフマギリンまたはフマギリンの誘導体である、請求項２６に記載の方法。
【請求項２８】
前記腫瘍細胞が卵巣がん細胞である、請求項２４に記載の方法。
【請求項２９】
前記阻害因子がｓｉＲＮＡである、請求項２４に記載の方法。
【請求項３０】
前記ｓｉＲＮＡが、配列番号１、配列番号２、配列番号３、配列番号４、配列番号５、配列番号６、配列番号７、配列番号８、配列番号９、配列番号５９、配列番号６０、配列番号６１、または配列番号６４～１０８もしくは配列番号１３４～１４４のうちの任意のものとして特定される、請求項２９に記載の方法。
【請求項３１】
卵巣がん患者の腫瘍が化学治療薬に対して抵抗性であるかどうかを予測する方法であって、

ａ．患者から採取された生物試料中の１または複数の発現遺伝子または該発現遺伝子によってコードされる遺伝子産物の量を検出する工程であって、該発現遺伝子がＳ１００Ａ１０、Ｓ１００Ａ１１、カルパイン２、ＳＰＡＲＣ、ＭｅｔＡＰ２、ＫＬＫ６、ＡＲＡ９、カルポニン２、ＲＮＰＳ１、ｅＩＦ５、ｅＩＦ２Ｂε、ＨＳＦ２、ＷＤＲ１、フューズドトウ（Ｆｕｓｅｄ　ｔｏｅｓ）、ＮＭ２３Ｄ、ＡＤＡＲ１、グランカルシン、ＮＢＲ１、ＳＡＰＫ／Ｅｒｋ１、亜鉛フィンガータンパク質－２６２ＭＹＭ、ＨＹＡ２２、ＭＲＰＬ４、ビネキシンβ、Ｇ－ＣＳＦＲ、ＩＧＦＢＰ－７、ＦＡＳＴキナーゼ、ＴＥＳＫ２、ＳＲＢ１、ＫＩＡＡ００８２、ＭＰＰ１０、ＨＭＴ１、ＮＡＩＰ、ｅＥＦ１ε、ＲＡＢ２２Ａ、ＮＣＯＲ２、またはＭＴ１である工程、

ｂ．対照試料中の１または複数の対応する発現遺伝子または該発現遺伝子によってコードされる遺伝子産物の量を検出する工程であって、該発現遺伝子がＳ１００Ａ１０、Ｓ１００Ａ１１、カルパイン２、ＳＰＡＲＣ、ＭｅｔＡＰ２、ＫＬＫ６、ＡＲＡ９、カルポニン２、ＲＮＰＳ１、ｅＩＦ５、ｅＩＦ２Ｂε、ＨＳＦ２、ＷＤＲ１、フューズドトウ（Ｆｕｓｅｄ　ｔｏｅｓ）、ＮＭ２３Ｄ、ＡＤＡＲ１、グランカルシン、ＮＢＲ１、ＳＡＰＫ／Ｅｒｋ１、亜鉛フィンガータンパク質－２６２ＭＹＭ、ＨＹＡ２２、ＭＲＰＬ４、ビネキシンβ、Ｇ－ＣＳＦＲ、ＩＧＦＢＰ－７、ＦＡＳＴキナーゼ、ＴＥＳＫ２、ＳＲＢ１、ＫＩＡＡ００８２、ＭＰＰ１０、ＨＭＴ１、ＮＡＩＰ、ｅＥＦ１ε、ＲＡＢ２２Ａ、ＮＣＯＲ２、またはＭＴ１である工程、ならびに

ｃ．工程（ａ）で検出される発現遺伝子または遺伝子産物の量を工程（ｂ）で検出される発現遺伝子または遺伝子産物の量と比較する工程

からなり、

工程（ａ）で検出される量が工程（ｂ）で検出される量と比べて少なくとも２０％異なる場合は、該患者が該化学治療薬に対して抵抗性であると予測される方法。

【請求項３２】

前記化学療法がプラチナ系の化学療法である、請求項３１に記載の方法。

【請求項３３】

前記発現遺伝子がＭｅｔＡＰ２またはＳＰＡＲＣである、請求項３１に記載の方法。

【請求項３４】

患者の卵巣がんの進行を観察するための方法であって、

ａ．患者から採取された生物試料中の１または複数の発現遺伝子または該発現遺伝子によってコードされる遺伝子産物の量を検出する工程であって、該発現遺伝子が、Ｓ１００Ａ１０、Ｓ１００Ａ１１、カルパイン２、ＳＰＡＲＣ、ＭｅｔＡＰ２、ＫＬＫ６、ＡＲＡ９、カルポニン２、ＲＮＰＳ１、ｅＩＦ５、ｅＩＦ２Ｂε、ＨＳＦ２、ＷＤＲ１、フューズドトウ（Ｆｕｓｅｄ　ｔｏｅｓ）、ＮＭ２３Ｄ、ＡＤＡＲ１、グランカルシン、ＮＢＲ１、ＳＡＰＫ／Ｅｒｋ１、亜鉛フィンガータンパク質－２６２ＭＹＭ、ＨＹＡ２２、ＭＲＰＬ４、ビネキシンβ、Ｇ－ＣＳＦＲ、ＩＧＦＢＰ－７、ＦＡＳＴキナーゼ、ＴＥＳＫ２、ＳＲＢ１、ＫＩＡＡ００８２、ＭＰＰ１０、ＨＭＴ１、ＮＡＩＰ、ｅＥＦ１ε、ＲＡＢ２２Ａ、ＮＣＯＲ２、またはＭＴ１である工程、

ｂ．その後の採取により該患者から得られた生物試料を用いて工程（ａ）を繰り返す工程、ならびに

ｃ．工程（ａ）で検出される発現遺伝子または遺伝子産物の量を工程（ｂ）で検出される発現遺伝子または遺伝子産物の量と比較する工程であって、工程（ｂ）で検出される量が、

ｉ．Ｓ１００Ａ１０、Ｓ１００Ａ１１、カルパイン２、ＳＰＡＲＣ、ＭｅｔＡＰ２、ＫＬＫ６、ＡＲＡ９、カルポニン２、ＲＮＰＳ１、Ｅｉｆ５、Ｅｉｆ２Ｂε、ＨＳＦ２、ＷＤＲ１、フューズドトウ（Ｆｕｓｅｄ　ｔｏｅｓ）、ＮＭ２３Ｄ、ＡＤＡＲ１、グランカルシン、ＮＢＲ１、ＳＡＰＫ／Ｅｒｋ１、亜鉛フィンガータンパク質－２６２ＭＹＭ、ＨＹＡ２２、ＭＲＰＬ４、ビネキシンβ、Ｇ－ＣＳＦＲ、ＩＧＦＢＰ－７、ＦＡＳＴキナーゼ、ＴＥＳＫ２、ＳＲＢ１、またはＫＩＡＡ００８２については、工程（ａ）で検出された量以上であるとき、および、

ｉｉ．ＭＰＰ１０、ＨＭＴ１、ＮＡＩＰ、Ｅｅｆ１ε、ＲＡＢ２２Ａ、ＮＣＯＲ２、またはＭＴ１については、工程（ａ）で検出された量以下であるとき
にがんが進行していることを特徴とする工程
からなる方法。
【請求項３５】
前記発現遺伝子がＥｉｆ５またはＳＰＡＲＣである、請求項３４に記載の方法。
【請求項３６】
化学療法抵抗性の腫瘍細胞の薬物抵抗性を低減させる化合物を同定する方法であって、
ａ．化学療法抵抗性の卵巣がん細胞で過剰発現される遺伝子を発現する細胞を、該細胞が抵抗性を有する濃度の化学療法薬とともに試験化合物に接触させる工程であって、該遺伝子が、Ｓ１００Ａ１０、Ｓ１００Ａ１１、カルパイン２、ＳＰＡＲＣ、ＭｅｔＡＰ２、ＫＬＫ６、ＡＲＡ９、カルポニン２、ＲＮＰＳ１、Ｅｉｆ５、Ｅｉｆ２Ｂε、ＨＳＦ２、ＷＤＲ１、フューズドトウ（Ｆｕｓｅｄ　ｔｏｅｓ）、ＮＭ２３Ｄ、ＡＤＡＲ１、グランカルシン、ＮＢＲ１、ＳＡＰＫ／Ｅｒｋ１、亜鉛フィンガータンパク質－２６２ＭＹＭ、ＨＹＡ２２、ＭＲＰＬ４、ビネキシンβ、Ｇ－ＣＳＦＲ、ＩＧＦＢＰ－７、ＦＡＳＴキナーゼ、ＴＥＳＫ２、ＳＲＢ１、またはＫＩＡＡ００８２である工程、
ｂ．該試験化合物の存在下および不在下での該遺伝子の発現を検出する工程、ならびに
ｃ．該試験化合物の存在下および不在下での該遺伝子の発現を比較する工程であって、該試験化合物の存在下での該遺伝子の発現が、該試験化合物の不在下での該遺伝子の発現と比べて低減されており、かつ、腫瘍細胞増殖が該化合物の存在下で低減されている場合、化合物が、化学療法抵抗性の腫瘍細胞増殖を抑制する化合物として同定されることを特徴とする工程
からなる方法。
【請求項３７】
化学療法抵抗性の腫瘍細胞の薬物抵抗性を低減させる化合物を同定する方法であって、
ａ．試験化合物を用いて、化学療法抵抗性の卵巣がん細胞で通常レベルより低いレベルで発現される遺伝子を発現する細胞を、該細胞が抵抗性を有する濃度の化学療法薬とともに試験化合物に接触させる工程であって、該遺伝子が、ＨＭＴ１、ＮＡＩＰ、Ｅｅｆ１ε、ＲＡＢ２２Ａ、ＮＣＯＲ２、ＭＴ１、またはＭＰＰ１０である工程、
ｂ．該試験化合物の存在下および不在下での該遺伝子の発現を検出する工程、ならびに
ｃ．該試験化合物の存在下および不在下での該遺伝子の発現を比較する工程であって、該試験化合物の存在下での該遺伝子の発現が、該試験化合物の不在下での該遺伝子の発現と比べて増大されており、かつ、腫瘍細胞増殖が該化合物の存在下で低減されている場合、化合物が、化学療法抵抗性の腫瘍細胞増殖を抑制する化合物として同定されることを特徴とする工程
からなる方法。
【請求項３８】
患者のがんを治療するための薬剤としての、薬剤組成物の有効性を観察する方法であって、
ａ．患者から採取された生物試料中の１または複数の発現遺伝子または該発現遺伝子によってコードされる遺伝子産物の量を検出する工程であって、該発現遺伝子が、Ｓ１００Ａ１０、Ｓ１００Ａ１１、カルパイン２、ＳＰＡＲＣ、ＭｅｔＡＰ２、ＫＬＫ６、ＡＲＡ９、カルポニン２、ＲＮＰＳ１、Ｅｉｆ５、Ｅｉｆ２Ｂε、ＨＳＦ２、ＷＤＲ１、フューズドトウ（Ｆｕｓｅｄ　ｔｏｅｓ）、ＮＭ２３Ｄ、ＡＤＡＲ１、グランカルシン、ＮＢＲ１、ＳＡＰＫ／Ｅｒｋ１、亜鉛フィンガータンパク質－２６２ＭＹＭ、ＨＹＡ２２、ＭＲＰＬ４、ビネキシンβ、Ｇ－ＣＳＦＲ、ＩＧＦＢＰ－７、ＦＡＳＴキナーゼ、ＴＥＳＫ２、ＳＲＢ１、ＫＩＡＡ００８２、またはＭＰＰ１０、ＨＭＴ１、ＮＡＩＰ、ＥｅＦ１ε、ＲＡＢ２２Ａ、ＮＣＯＲ２、ＭＴ１である工程、
ｂ．ある量の薬剤組成物を該患者に投与する工程、

ｃ．その後の採取により該患者から得られた生物試料を用いて工程（ａ）を繰り返す工程、ならびに
ｄ．工程（ａ）で検出される発現遺伝子または遺伝子産物の量を工程（ｃ）で検出される発現遺伝子または遺伝子産物の量と比較する工程であって、工程（ａ）で採取された生物試料に対する、その後に採取された生物試料中の発現遺伝子または遺伝子産物の量の変化を検出することによって該薬剤組成物の有効性を観察し、かつ、該組成物の存在下で腫瘍細胞増殖が低減されていることを特徴とする工程
からなる方法。
【請求項３９】
結腸がんを検出する方法であって、
ａ．患者から生物試料を得る工程、
ｂ．該生物試料中の１または複数の発現遺伝子または該発現遺伝子によってコードされる遺伝子産物の量を検出する工程であって、該発現遺伝子がＳ１００Ａ１０、Ｓ１００Ａ１１、カルパイン２、ＳＰＡＲＣ、またはＭｅｔＡＰ２である工程、
ｃ．対照試料中で検出される１または複数の発現遺伝子または遺伝子産物の量を検出する工程、
ｄ．工程（ｂ）から得られる１または複数の発現遺伝子または遺伝子産物の量を工程（ｃ）での量と比較する工程
からなり、
工程（ｂ）で検出される１または複数の遺伝子の量が、工程（ｃ）で検出される１または複数の遺伝子の量と異なる場合に結腸がんが検出されることを特徴とする方法。
【請求項４０】
工程（ｂ）のＳ１００Ａ１０、Ｓ１００Ａ１１、ＳＰＡＲＣ、またはＭｅｔＡＰ２の量が、工程（ｃ）での量と比べて増加している場合に結腸がんが検出される、請求項３９に記載の方法。
【請求項４１】
工程（ｂ）のカルパイン２の量が、工程（ｃ）での量と比べて減少している場合に結腸がんが検出される、請求項３９に記載の方法。
【請求項４２】
前記修飾因子がｓｉＲＮＡまたはｓｈＲＮＡである、請求項１に記載の方法。
【請求項４３】
前記修飾因子が１９、２０、または２１ヌクレオチド長のｓｉＲＮＡである、請求項４２に記載の方法。
【請求項４４】
前記修飾因子が１９、２０、または２１ヌクレオチド長のアームを有するヘアピンループを形成するｓｈＲＮＡである、請求項４２に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本出願は、その開示内容を本願明細書に援用する、２００３年１２月３１日出願の米国仮特許出願第６０／５３３５０５号に関連し、同出願に対する優先権を主張する。
（発明の分野）
本発明は、ある卵巣がん患者が化学療法に対して抵抗性であるかどうかを予測するための方法、ならびに個々の患者が結腸がんを有するかどうかを決定するための方法に関する。本発明はまた、卵巣がんを治療される患者における治療の有効性を観察するための方法にも関する。本発明はさらに、卵巣がんおよび結腸がんを治療するための方法にも関する。さらに、本発明は、腫瘍細胞、特に卵巣がん細胞または結腸がん細胞の増殖を抑制することができる化合物をスクリーニングする方法にも関する。本発明はまた、特に、従来の化学療法的治療法に対して抵抗性である卵巣がん細胞において、化学療法薬による治療または療法に対する抵抗性を低減または抑制するための方法にも関する。

【背景技術】
【０００２】
（発明の背景）
卵巣がんは、婦人科の悪性腫瘍のうちで最も致死的であり、死亡率は６０％である。この疾患の様々な臨床病期に対する５年生存率は、次のとおり：病期Ｉ＞９０％、病期ＩＩ＝８０％、病期ＩＩＩ＝２０％、および病期ＩＶ＝１０％；であり、この疾患の後期では生存率が著しく低下する。この疾患の進行期に対する医療標準の治療には、腫瘍縮小手術とそれに続く化学療法が含まれる。
【０００３】
全患者の約７５％が疾患の病期ＩＩＩおよびＩＶで診断を受け、また、進行期の疾患の診断の遅れには予後不良が伴うため、大半の患者にとって、生き残る確率は低い。現在利用可能な化学療法剤に対する抵抗性は、別の主要な問題である。初期治療後に７５％の患者で臨床的な完全寛解が実現されるにもかかわらず、大半の患者は、再発性の疾患を発症し、再治療を必要とするようになる。残念ながら、圧倒的多数が最終的には化学療法抵抗性を生じるようになり、その疾患に屈することになる。
【０００４】
化学療法抵抗性は、いくつかの遺伝子および遺伝子産物の発現および生物活性の変化を伴う複雑な現象である。応答性の個体および非応答性の個体で異なって発現される遺伝子または遺伝子ファミリーは、一般に臨床的に使用されるような、ある特定の化学療法剤またはその組合せに対してどの患者が抵抗性であるかを予測するための分子マーカーとして使用することができる。さらに、化学療法抵抗性の個体で過剰発現される遺伝子は、１または複数の化学療法剤に対するがん細胞の抵抗性を低減させ得る、阻害のための標的となり得る。
【０００５】
卵巣がんと同様に、結腸直腸がんの患者の生存率は、疾患が早期に診断されたときに最も良い。がんが早期に発見された場合は、結腸がん患者の５年生存率は約９０％であるが、残念ながら、サーベイランスおよび予防手段の増加にもかかわらず、がんの３７％しかこのような早期には発見されていない。がんが局部的に拡大して他の臓器に影響を与えている場合は、生存率は約６４％に低下し、がんが転移した後では大幅に低下する（８％）（非特許文献１）。
【非特許文献１】Ｃａｎｃｅｒ Ｆａｃｔｓ ａｎｄ Ｆｉｇｕｒｅｓ ２００２；アメリカがん協会（Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｓｏｃｉｅｔｙ）発行物
【発明の開示】
【発明が解決しようとする課題】
【０００６】
したがって、疾患の進行過程で早期に結腸がんおよび卵巣がんを同定することが必要であり、化学療法抵抗性のがんを同定することが特に必要である。より詳細には、がん細胞の腫瘍形成能および化学療法薬に対する抵抗性の双方に関して、がん細胞の挙動は、完全には明確にされていない特定の遺伝子のセットの発現によって媒介されているとして当技術分野で理解されているため、卵巣がんの化学療法抵抗性についての有効な分子マーカーとしての機能を果たす遺伝子および遺伝子群または遺伝子セット、ならびに卵巣がんおよび結腸がんに対する臨床的に有効な治療標的を提供するそのような遺伝子または遺伝子セットを同定することが当技術分野で必要とされている。
【課題を解決するための手段】
【０００７】
本発明は、化学療法薬による治療に対する抵抗性に関与する遺伝子、またはその発現が該抵抗性により修飾される遺伝子、あるいは、前記修飾された発現が抵抗性に関連し、または抵抗性を司っている遺伝子を同定するための方法および試薬を提供する。具体的には、本発明は、化学療法薬による治療に対する抵抗性に関与する遺伝子、またはその発現がそのように修飾される遺伝子、あるいは、前記修飾された発現が抵抗性に関連し、または

抵抗性を司っている遺伝子、ならびに、化学療法薬抵抗性の細胞、特に薬物抵抗性の卵巣がん細胞に特徴的な、複数の遺伝子の修飾された遺伝子発現パターンを提供する。本発明はさらに、１または複数の前記遺伝子の発現または活性と相互に作用し、あるいはそれらに影響を及ぼす化合物を同定するための方法も提供する。また、卵巣がん、特に従来の化学療法的治療に対して抵抗性の、または抵抗性となってしまったがんを治療するための、化学療法剤の代替として有用な、または化学療法剤と併用すると有用な前記化合物も提供される。本発明はさらに、化学療法剤に対して抵抗性の腫瘍または抵抗性となった腫瘍を有する患者を同定するために化学療法的治療を観察するための方法および試薬も提供する。

【０００８】

本発明は、化学療法剤に対して抵抗性である腫瘍細胞、最も好ましくは卵巣がん細胞の化学療法薬抵抗性を低減させ、かつ増殖を抑制、遅延、または防止する化合物を同定するための方法を提供する。この方法は、（ａ）化学療法薬抵抗性細胞がその化学療法薬に対して抵抗性であり、かつその細胞が化学療法抵抗性の卵巣がん細胞で過剰発現される少なくとも１種の遺伝子を発現している期間または濃度の化学療法薬の存在下で増殖している化学療法薬抵抗性細胞を、試験化合物と接触させる工程であって、その過剰発現遺伝子が（表１に示すＧｅｎＢａｎｋ登録番号で特定されている）Ｓ１００Ａ１０、Ｓ１００Ａ１１、カルパイン２、ＳＰＡＲＣ、ＭｅｔＡＰ２、ＫＬＫ６、ＡＲＡ９、カルポニン２、ＲＮＰＳ１、ｅＩＦ５、ｅＩＦ２Ｂε、ＨＳＦ２、ＷＤＲ１、フューズドトウ（Ｆｕｓｅｄ ｔｏｅｓ）、ＮＭ２３Ｄ、ＡＤＡＲ１、グランカルシン（Ｇｒａｎｃａｌｃｉｎ）、ＮＢＲ１、ＳＡＰＫ／Ｅｒｋ１、亜鉛フィンガータンパク質－２６２ＭＹＭ、ＨＹＡ２２、ＭＲＰＬ４、ビネキシンβ、Ｇ－ＣＳＦＲ、ＩＧＦＢＰ－７、ＦＡＳＴキナーゼ、ＴＥＳＫ２、ＳＲＢ１、またはＫＩＡＡ００８２である工程、（ｂ）その試験化合物の存在下および不在下において１または複数の前記遺伝子または遺伝子産物の発現または活性について前記細胞を分析する工程、ならびに／あるいは、（ｃ）その試験化合物の存在下および不在下において細胞増殖および／または遺伝子もしくは遺伝子産物のうちの少なくとも１種の発現もしくは活性を比較する工程からなり、試験化合物の存在下での遺伝子または遺伝子産物の発現または活性が、試験化合物の不在下での遺伝子発現と比べて低減している場合、または、細胞増殖がその化合物の存在下では抑制される場合、あるいはその双方の場合に、化合物が、化学療法抵抗性の腫瘍細胞の増殖を抑制する化合物として同定される。いくつかの実施形態では、特に、本明細書で特定する複数の遺伝子産物に特異的な核酸（遺伝子）プローブまたは抗体のアレイを用いて生物試料を分析することによって遺伝子発現を検出する。

【０００９】

さらに、本発明は、化学療法剤に対して抵抗性である腫瘍細胞、最も好ましくは卵巣がん細胞の薬物抵抗性を低減させ、かつ増殖を抑制、遅延、または防止する化合物を同定するための方法も提供する。この方法は、（ａ）細胞がその化学療法薬に対して抵抗性であり、かつその細胞が化学療法感受性の細胞と比べて化学療法抵抗性の卵巣がん細胞では低いレベルで発現される遺伝子を発現している期間または濃度の化学療法薬の存在下で増殖している細胞を、試験化合物と接触させる工程であって、その遺伝子が、（表１に示すＧｅｎＢａｎｋ登録番号で特定されている）ＨＭＴ１、ＮＡＩＰ、ｅＥＦ１ε、ＲＡＢ２２Ａ、ＮＣＯＲ２、ＭＴ１、またはＭＰＰ１０である工程、ｂ）試験化合物の存在下および不在下で細胞増殖および／または遺伝子発現もしくは遺伝子産物の活性について前記細胞を分析する工程、ならびにｃ）試験化合物の存在下および不在下での遺伝子の発現または遺伝子産物の活性を比較する工程からなり、（ｉ）試験化合物の存在下での遺伝子の発現または遺伝子産物の活性が、試験化合物の不存下での遺伝子の発現または遺伝子産物の活性と比べて増大している場合、および／または（ｉｉ）細胞増殖がその化合物の存在下で抑制されている場合、および／または（ｉｉｉ）細胞増殖が抑制されている一方で、その遺伝子の発現および／または活性が増大している場合に、化合物は、化学療法抵抗性の腫瘍細胞の増殖を抑制する化合物として同定される。いくつかの実施形態では、特に、本明

細書で特定する複数の遺伝子産物に特異的な核酸（遺伝子）プローブまたは抗体のアレイを用いて生物試料を分析することによって遺伝子発現を検出する。

【００１０】

本発明は、腫瘍細胞の薬物抵抗性を低減させるため、または腫瘍細胞の増殖を抑制、遅延、もしくは防止するため、あるいはその双方のための方法を提供し、該方法は、腫瘍細胞を、その細胞が細胞遺伝子阻害因子の不在下では化学療法薬に対して抵抗性であるような期間または濃度の化学療法薬の存在下で、細胞遺伝子の少なくとも１種の阻害因子に接触させる工程であって、その細胞遺伝子が、Ｓ１００Ａ１０、Ｓ１００Ａ１１、カルパイン２、ＳＰＡＲＣ、ＭｅｔＡＰ２、ＫＬＫ６、ＡＲＡ９、カルポニン２、ＲＮＰＳ１、ｅＩＦ５、ｅＩＦ２Ｂε、ＨＳＦ２、ＷＤＲ１、フューズドトウ（Ｆｕｓｅｄ　ｔｏｅｓ）、ＮＭ２３Ｄ、ＡＤＡＲ１、グランカルシン、ＮＢＲ１、ＳＡＰＫ／Ｅｒｋ１、亜鉛フィンガータンパク質－２６２ＭＹＭ、ＨＹＡ２２、ＭＲＰＬ４、ビネキシンβ、Ｇ－ＣＳＦＲ、ＩＧＦＢＰ－７、ＦＡＳＴキナーゼ、ＴＥＳＫ２、ＳＲＢ１、またはＫＩＡＡ００８２である工程からなる方法である。好ましい実施形態では、腫瘍細胞はヒトの腫瘍細胞であり、より好ましくは卵巣がん細胞である。特定の態様では、本発明によって同定される１または複数の遺伝子は、１または複数の前記遺伝子を標的にするように特異的に設計されたアンチセンスＲＮＡ分子またはｓｉＲＮＡ分子で阻害される。代替態様では、前記遺伝子の遺伝子産物が、それらのタンパク質の阻害因子を用いて阻害される。

【００１１】

本発明は、腫瘍細胞の薬物抵抗性を低減させるための方法を提供し、該方法は、腫瘍細胞を、その細胞が細胞遺伝子ＨＭＴ１、ＮＡＩＰ、ｅＥＦ１ε、ＲＡＢ２２Ａ、ＮＣＯＲ２、ＭＴ１、またはＭＰＰ１０の発現または活性を増大させる化合物の不在下では化学療法薬に対して抵抗性である期間または濃度の化学療法薬の存在下または不在下で、ＨＭＴ１、ＮＡＩＰ、ｅＥＦＩε、ＲＡＢ２２Ａ、ＮＣＯＲ２、ＭＴ１、またはＭＰＰ１０の発現または活性を増大させる少なくとも１種の化合物に接触させる工程からなる方法である。好ましい実施形態では、腫瘍細胞はヒトの腫瘍細胞であり、より好ましくは卵巣がん細胞である。

【００１２】

本発明は、腫瘍細胞の増殖を抑制、遅延、または防止するための方法も提供し、該方法は、腫瘍細胞を、細胞増殖が、細胞遺伝子ＨＭＴ１、ＮＡＩＰ、ｅＥＦ１ε、ＲＡＢ２２Ａ、ＮＣＯＲ２、ＭＴ１、またはＭＰＰ１０の発現または活性を増大させる化合物の存在下では、前記化合物の不在下での細胞増殖と比べて減速または抑制される期間または濃度の化学療法薬の存在下または不在下で、ＨＭＴ１、ＮＡＩＰ、ｅＥＦ１ε、ＲＡＢ２２Ａ、ＮＣＯＲ２、ＭＴ１、またはＭＰＰ１０の発現または活性を増大させる少なくとも１種の化合物に接触させる工程からなる方法である。好ましい実施形態では、腫瘍細胞はヒトの腫瘍細胞であり、より好ましくは卵巣がん細胞である。

【００１３】

別の態様では、本発明は、腫瘍細胞、最も好ましくは卵巣がん細胞の増殖を抑制、遅延、または防止するための方法を提供し、該方法は、腫瘍細胞を、１または複数の化学療法剤および細胞遺伝子の少なくとも１種の阻害因子の組合せに接触させる工程であって、その細胞遺伝子が、Ｓ１００Ａ１０、Ｓ１００Ａ１１、カルパイン２、ＳＰＡＲＣ、ＭｅｔＡＰ２、ＫＬＫ６、ＡＲＡ９、カルポニン２、ＲＮＰＳ１、ｅＩＦ５、ｅＩＦ２Ｂε、ＷＤＲ１、フューズドトウ（Ｆｕｓｅｄ　ｔｏｅｓ）、ＮＭ２３Ｄ、グランカルシン、ＳＡＰＫ／Ｅｒｋ１、亜鉛フィンガータンパク質－２６２ＭＹＭ、ＨＹＡ２２、ビネキシンβ、Ｇ－ＣＳＦＲ、ＩＧＦＢＰ－７、またはＫＩＡＡ００８２である工程からなる方法である。特定の態様では、細胞遺伝子はＭｅｔＡＰ２であり、化学療法剤はプラチナ系であり、少なくとも１種の阻害因子はフマギリンまたはフマギリン誘導体である。別の特定の態様では、細胞遺伝子はカルパイン２であり、化学療法剤はプラチナ系であり、少なくとも１種の阻害因子はＮ－アセチル－ロイシル－ロイシル－ノルロイシナール（ＡＬＬＮ）またはその誘導体である。表１に示す細胞遺伝子の阻害因子は、例えば、表１に示す遺伝子

を標的にするように特異的に設計されたｓｉＲＮＡ分子もしくはｓｈＲＮＡ分子であってもよいし、小分子阻害因子でもよい。

【００１４】

別の態様では、本発明は、腫瘍細胞、最も好ましくは卵巣がん細胞の増殖を抑制、遅延、または防止するための方法を提供し、該方法は、腫瘍細胞を、１または複数の化学療法剤および細胞遺伝子の発現または活性を増大させる少なくとも１種の化合物の組合せに接触させる工程であって、その細胞遺伝子が、ＨＭＴ１、ＮＡＩＰ、ｅＥＦ１ε、ＲＡＢ２２Ａ、ＮＣＯＲ２、ＭＴ１、またはＭＰＰ１０である工程からなる方法である。好ましい実施形態では、腫瘍細胞はヒトの腫瘍細胞であり、より好ましくは卵巣がん細胞である。

【００１５】

本発明は、卵巣がん患者の腫瘍が化学療法的治療に対して抵抗性であるかどうかを予測する方法も提供し、該方法は、（ａ）患者から採取した生物試料中の１または複数の発現遺伝子または該遺伝子によってコードされる遺伝子産物の量を検出する工程であって、その発現遺伝子がＳ１００Ａ１０、Ｓ１００Ａ１１、カルパイン２、ＳＰＡＲＣ、ＭｅｔＡＰ２、ＫＬＫ６、ＡＲＡ９、カルポニン２、ＲＮＰＳ１、ｅＩＦ５、ｅＩＦ２Ｂε、ＨＳＦ２、ＷＤＲ１、フューズドトウ（Ｆｕｓｅｄ　ｔｏｅｓ）、ＮＭ２３Ｄ、ＡＤＡＲ１、グランカルシン、ＮＢＲ１、ＳＡＰＫ／Ｅｒｋ１、亜鉛フィンガータンパク質－２６２ＭＹＭ、ＨＹＡ２２、ＭＲＰＬ４、ビネキシンβ、Ｇ－ＣＳＦＲ、ＩＧＦＢＰ－７、ＦＡＳＴキナーゼ、ＴＥＳＫ２、ＳＲＢ１、またはＫＩＡＡ００８２である工程、（ｂ）工程（ａ）で検出される１または複数の発現遺伝子または遺伝子産物に対応して、非腫瘍組織試料、最も好ましくは腫瘍の元の組織に由来する非腫瘍組織試料、または化学療法に良く反応した患者に由来する組織試料を含む対照試料中の１または複数の発現遺伝子または該遺伝子によってコードされる遺伝子産物の量を検出する工程であって、その発現遺伝子がＳ１００Ａ１０、Ｓ１００Ａ１１、カルパイン２、ＳＰＡＲＣ、ＭｅｔＡＰ２、ＫＬＫ６、ＡＲＡ９、カルポニン２、ＲＮＰＳ１、ｅＩＦ５、ｅＩＦ２Ｂε、ＨＳＦ２、ＷＤＲ１、フューズドトウ（Ｆｕｓｅｄ　ｔｏｅｓ）、ＮＭ２３Ｄ、ＡＤＡＲ１、グランカルシン、ＮＢＲ１、ＳＡＰＫ／Ｅｒｋ１、亜鉛フィンガータンパク質－２６２ＭＹＭ、ＨＹＡ２２、ＭＲＰＬ４、ビネキシンβ、Ｇ－ＣＳＦＲ、ＩＧＦＢＰ－７、ＦＡＳＴキナーゼ、ＴＥＳＫ２、ＳＲＢ１、またはＫＩＡＡ００８２である工程、ならびに（ｃ）工程（ａ）で測定された発現遺伝子または遺伝子産物の量を工程（ｂ）で検出された発現遺伝子または遺伝子産物の量と比較する工程からなり、工程（ａ）で検出される量が工程（ｂ）で検出される量より少なくとも２０％多い場合は、その患者が化学療法に対して抵抗性であると予測される方法である。特定の態様では、生物試料は腫瘍試料である。特定の態様では、対照試料は化学療法に反応性のがん患者から得た生物試料である。いくつかの実施形態では、特に、本明細書で特定する複数の遺伝子産物に特異的な核酸（遺伝子）プローブまたは抗体のアレイを用いて生物試料を分析することによって、遺伝子発現を検出する。

【００１６】

特定の態様では、この方法は、がん患者から得た生物試料で発現されるＭｅｔＡＰ２の測定量が、化学療法薬に反応性の個体または卵巣がんではない個体から得た卵巣組織で検出される量より多いとき、患者がプラチナ系の化学療法に対して抵抗性であることを予測する。

【００１７】

本発明はまた、卵巣がん患者の腫瘍が化学療法的治療に対して抵抗性であるかどうかを予測する方法も提供し、該方法は、（ａ）患者から採取した生物試料中の１または複数の発現遺伝子または該遺伝子によってコードされる遺伝子産物の量を検出する工程であって、その発現遺伝子がＨＭＴ１、ＮＡＩＰ、ｅＥＦ１ε、ＲＡＢ２２Ａ、ＮＣＯＲ２、ＭＴ１、またはＭＰＰ１０である工程、（ｂ）工程（ａ）で検出される１または複数の発現遺伝子または遺伝子産物に対応する対照試料中の１または複数の発現遺伝子または該遺伝子によってコードされる遺伝子産物の量を検出する工程であって、その発現遺伝子がＨＭＴ１、ＮＡＩＰ、ｅＥＦ１ε、ＲＡＢ２２Ａ、ＮＣＯＲ２、ＭＴ１、またはＭＰＰ１０であ

る工程、ならびに（ｃ）工程（ａ）で測定された発現遺伝子または遺伝子産物の量を工程（ｂ）で検出された発現遺伝子または遺伝子産物の量と比較する工程からなり、工程（ａ）で検出される量が工程（ｂ）で検出される量より少なくとも２０％、より好ましくは少なくとも５０％少ない場合は、その患者が化学療法に対して抵抗性であると予測される方法である。特定の態様では、対照試料は化学療法に反応性のがん患者から得た生物試料である。特定の態様では、生物試料は腫瘍試料である。いくつかの実施形態では、特に、本明細書で特定する複数の遺伝子産物に特異的な核酸（遺伝子）プローブまたは抗体のアレイを用いて生物試料を分析することによって、遺伝子発現を検出する。

【００１８】

本発明はさらに、卵巣がん患者、特に化学療法的治療を受けている卵巣がん患者における疾患の進行を観察するための方法を提供し、該方法は、（ａ）患者から採取した生物試料中の１または複数の発現遺伝子または該遺伝子によってコードされる遺伝子産物の量を検出する工程であって、その発現遺伝子が、Ｓ１００Ａ１０、Ｓ１００Ａ１１、カルパイン２、ＳＰＡＲＣ、ＭｅｔＡＰ２、ＫＬＫ６、ＡＲＡ９、カルポニン２、ＲＮＰＳ１、ｅＩＦ５、ｅＩＦ２Ｂε、ＨＳＦ２、ＷＤＲ１、フューズドトウ（Ｆｕｓｅｄ　ｔｏｅｓ）、ＮＭ２３Ｄ、ＡＤＡＲ１、グランカルシン、ＮＢＲ１、ＳＡＰＫ／Ｅｒｋ１、亜鉛フィンガータンパク質－２６２ＭＹＭ、ＨＹＡ２２、ＭＲＰＬ４、ビネキシンβ、Ｇ－ＣＳＦＲ、ＩＧＦＢＰ－７、ＦＡＳＴキナーゼ、ＴＥＳＫ２、ＳＲＢ１、またはＫＩＡＡ００８２である工程、（ｂ）その後の採取により患者から得た生物試料を用いて工程（ａ）を繰り返す工程、ならびに（ｃ）工程（ａ）で検出された発現遺伝子または遺伝子産物の量を工程（ｂ）で検出された発現遺伝子または遺伝子産物の量と比較する工程からなり、工程（ａ）で採取した生物試料に対する、その後採取した生物試料中の発現遺伝子または遺伝子産物の量の変化を検出することによって疾患の進行を観察し、その際、工程（ｂ）で検出された発現遺伝子または発現遺伝子の産物の量が、工程（ａ）で検出された発現遺伝子または遺伝子産物の量と比べて多いときに疾患の進行が検出される方法である。いくつかの実施形態では、患者は、工程（ａ）における遺伝子発現量の検出と工程（ｂ）におけるその量の検出との間に化学療法的治療または他の治療を受ける。特定の態様では、生物試料は腫瘍試料である。好ましい実施形態では、特に、本明細書で特定する複数の遺伝子産物に特異的な核酸（遺伝子）プローブまたは抗体のアレイを用いて生物試料を分析することによって、遺伝子発現を検出する。

【００１９】

本発明はさらに、卵巣がん患者、特に化学療法的治療を受けている卵巣がん患者における疾患の進行を観察するための方法を提供し、該方法は、（ａ）患者から採取した生物試料中の１または複数の発現遺伝子または該遺伝子によってコードされる遺伝子産物の量を検出する工程であって、その発現遺伝子が、ＨＭＴ１、ＮＡＩＰ、ｅＥＦ１ε、ＲＡＢ２２Ａ、ＮＣＯＲ２、ＭＴ１、またはＭＰＰ１０である工程、（ｂ）その後の採取により患者から得た生物試料を用いて工程（ａ）を繰り返す工程、ならびに（ｃ）工程（ａ）で検出された発現遺伝子または遺伝子産物の量を工程（ｂ）で検出された発現遺伝子または遺伝子産物の量と比較する工程からなり、工程（ａ）で採取した生物試料に対する、後で採取した生物試料中の発現遺伝子または遺伝子産物の量の変化を検出することによって疾患の進行を観察し、その際、工程（ｂ）で検出された発現遺伝子または発現遺伝子の産物の量が、工程（ａ）で検出された発現遺伝子または遺伝子産物の量と比べて少ないかまたは等しいときに疾患の進行が検出される方法である。いくつかの実施形態では、患者は、工程（ａ）における遺伝子発現量の検出と工程（ｂ）におけるその量の検出との間に化学療法的治療または他の治療を受ける。特定の態様では、生物試料は腫瘍試料である。いくつかの実施形態では、特に、本明細書で特定する複数の遺伝子産物に特異的な核酸（遺伝子）プローブまたは抗体のアレイを用いて生物試料を分析することによって、遺伝子発現を検出する。

【００２０】

さらに、本発明は、患者のがん、特に卵巣がんまたは結腸がんを治療する薬剤としての

、薬剤組成物の有効性を観察するための方法を提供し、該方法は、（ａ）患者から採取した生物試料中の１または複数の発現遺伝子または該遺伝子によってコードされる遺伝子産物の量を検出する工程であって、その発現遺伝子が、Ｓ１００Ａ１０、Ｓ１００Ａ１１、カルパイン２、ＳＰＡＲＣ、ＭｅｔＡＰ２、ＫＬＫ６、ＡＲＡ９、カルポニン２、ＲＮＰＳ１、ｅＩＦ５、ｅＩＦ２Ｂε、ＨＳＦ２、ＷＤＲ１、フューズドトウ（Ｆｕｓｅｄ ｔｏｅｓ）、ＮＭ２３Ｄ、ＡＤＡＲ１、グランカルシン、ＮＢＲ１、ＳＡＰＫ／Ｅｒｋ１、亜鉛フィンガータンパク質－２６２ＭＹＭ、ＨＹＡ２２、ＭＲＰＬ４、ビネキシンβ、Ｇ－ＣＳＦＲ、ＩＧＦＢＰ－７、ＦＡＳＴキナーゼ、ＴＥＳＫ２、ＳＲＢ１、またはＫＩＡＡ００８２である工程、（ｂ）ある量の薬剤組成物をその患者に投与する工程、（ｃ）その後の採取により患者から得た生物試料を用いて工程（ａ）を繰り返す工程、ならびに（ｄ）工程（ａ）で検出された発現遺伝子または遺伝子産物の量を工程（ｃ）で検出された発現遺伝子または遺伝子産物の量と比較する工程からなり、工程（ａ）で採取した生物試料に対する、後で採取した生物試料中の発現遺伝子または遺伝子産物の量の変化を検出することによって、薬剤組成物の有効性を観察し、その際、工程（ｃ）で検出された発現遺伝子または発現遺伝子の産物の量が、工程（ａ）で検出された発現遺伝子または遺伝子産物の量より少ないとき、および、薬剤組成物の存在下で腫瘍の増殖が低減されている（すなわち、減速され、遅延され、または抑制されている）場合に、その薬剤組成物が有効であるとする方法である。特定の態様では、生物試料は腫瘍試料である。いくつかの実施形態では、特に、本明細書で特定する複数の遺伝子産物に特異的な核酸（遺伝子）プローブまたは抗体のアレイを用いて生物試料を分析することによって、遺伝子発現を検出する。

【００２１】

本発明は、患者のがん、特に卵巣がんを治療する薬剤としての、薬剤組成物の有効性を観察するための方法も提供し、該方法は、（ａ）患者から採取した生物試料中の１または複数の発現遺伝子または該遺伝子によってコードされる遺伝子産物の量を検出する工程であって、その発現遺伝子が、ＨＭＴ１、ＮＡＩＰ、ｅＥＦ１ε、ＲＡＢ２２Ａ、ＮＣＯＲ２、ＭＴ１、またはＭＰＰ１０である工程、（ｂ）ある量の薬剤組成物をその患者に投与する工程、（ｃ）その後の採取により患者から得た生物試料を用いて工程（ａ）を繰り返す工程、ならびに（ｄ）工程（ａ）で検出された発現遺伝子または遺伝子産物の量を工程（ｃ）で検出された発現遺伝子または遺伝子産物の量と比較する工程からなり、工程（ａ）で採取した生物試料に対して、後で採取した生物試料中の発現遺伝子または遺伝子産物の量の変化を検出することによって薬剤組成物の有効性を観察し、その際、工程（ｃ）で検出された発現遺伝子または発現遺伝子の産物の量が、工程（ａ）で検出された発現遺伝子または遺伝子産物の量より多いとき、および薬剤組成物の存在下で腫瘍の増殖が低減されている（すなわち、減速され、遅延され、または抑制されている）場合に、その薬剤組成物が有効であるとする方法である。特定の態様では、生物試料は腫瘍試料である。いくつかの実施形態では、特に、本明細書で特定する複数の遺伝子産物に特異的な核酸（遺伝子）プローブまたは抗体のアレイを用いて生物試料を分析することによって、遺伝子発現を検出する。

【００２２】

本発明は結腸がんを発見する方法も提供し、該方法は、（ａ）動物、好ましくはヒトから生物試料を得る工程、（ｂ）生物試料中の１または複数の発現遺伝子または該遺伝子によってコードされる遺伝子産物の量を検出する工程であって、その発現遺伝子が、Ｓ１００Ａ１０、Ｓ１００Ａ１１、カルパイン２、ＳＰＡＲＣ、またはＭｅｔＡＰ２である工程、（ｃ）非腫瘍結腸組織試料を含む対照試料中で検出される１または複数の発現遺伝子または遺伝子産物の量を検出する工程、ならびに（ｄ）工程（ｂ）から得られる１または複数の発現遺伝子または遺伝子産物の量を工程（ｃ）での量と比較する工程からなり、工程（ｃ）での量と比べて工程（ｂ）での量に差がある場合に結腸がんが検出される方法である。検出される差は、工程（ｃ）で採取した生物試料に対する、工程（ａ）で採取した生物試料における１または複数の前記遺伝子の過剰発現でもよく、１または複数の前記遺伝子の不足または過小発現でもよい。例えば、Ｓ１００Ａ１０、Ｓ１００Ａ１１、ＳＰＡＲ

Ｃ、および／またはＭｅｔＡＰ２の量が、工程（ｃ）での量と比べて工程（ｂ）において多い場合、ならびに／あるいはカルパイン２の量が、工程（ｃ）での量より工程（ｂ）において少ない場合は、結腸がんが発見される。いくつかの実施形態では、動物は、ヒト、好ましくは結腸がんを有するヒトである。好ましくは、生物試料は、結腸のスクリーニング作業をするための組織試料として当技術分野で一般に使用される、結腸組織試料、より好ましくはポリープ、さらにより好ましくは腺腫様（ａｄｅｍａｔｏｕｓ）ポリープである。いくつかの実施形態では、特に、本明細書で特定する複数の遺伝子産物に特異的な核酸（遺伝子）プローブまたは抗体のアレイを用いて生物試料を分析することによって、遺伝子発現を検出する。

【００２３】

さらに別の実施形態では、本発明は、動物、好ましくはヒトにおけるがんおよび／または化学療法薬抵抗性を診断するための方法を提供し、該方法は、２もしくは複数の発現遺伝子または該遺伝子によってコードされる遺伝子産物量の変化のパターンを検出する工程からなる方法である。ある特定の実施形態では、これらの発現遺伝子は、表１に示される遺伝子である。一般に、本発明のこれらの方法は、（ａ）動物、好ましくはヒトから生物試料を得る工程、（ｂ）その生物試料中の、表１に示される２もしくは複数の発現遺伝子または該遺伝子によってコードされる遺伝子産物の量を検出する工程、（ｃ）対照試料中で検出される２もしくは複数の発現遺伝子または遺伝子産物の量を検出する工程、ならびに（ｄ）工程（ｂ）から得られる２もしくは複数の発現遺伝子または遺伝子産物の量を工程（ｃ）での量と比較することによって、２もしくは複数の発現遺伝子または該遺伝子によってコードされる遺伝子産物の量の変化のパターンを決定する工程からなり、そのパターンが、がん、例えば、結腸がんもしくは卵巣がん、または薬物抵抗性、例えばシスプラチンに対する抵抗性と関連づけられる。いくつかの実施形態では、特に、本明細書で特定する複数の遺伝子産物に特異的な核酸（遺伝子）プローブまたは抗体のアレイを用いて生物試料を分析することによって、遺伝子発現を検出する。

【００２４】

本発明は、卵巣がんの動物における化学療法薬抵抗性を検出するための方法も提供し、該方法は、（ａ）動物から採取した生物試料中の複数の発現遺伝子または該遺伝子によってコードされる遺伝子産物の量を検出する工程であって、その発現遺伝子が、Ｓ１００Ａ１０、Ｓ１００Ａ１１、カルパイン２、ＳＰＡＲＣ、ＭｅｔＡＰ２、ＫＬＫ６、ＡＲＡ９、カルポニン２、ＲＮＰＳ１、ｅＩＦ５、ｅＩＦ２Ｂε、ＨＳＦ２、ＷＤＲ１、フューズドトウ（Ｆｕｓｅｄ　ｔｏｅｓ）、ＮＭ２３Ｄ、ＡＤＡＲ１、グランカルシン、ＮＢＲ１、ＳＡＰＫ／Ｅｒｋ１、亜鉛フィンガータンパク質－２６２ＭＹＭ、ＨＹＡ２２、ＭＲＰＬ４、ビネキシンβ、Ｇ－ＣＳＦＲ、ＩＧＦＢＰ－７、ＦＡＳＴキナーゼ、ＴＥＳＫ２、ＳＲＢ１、またはＫＩＡＡ００８２である工程、（ｂ）工程（ａ）で検出される複数の発現遺伝子または遺伝子産物に対応する、非腫瘍卵巣組織または化学療法に反応性の患者に由来する腫瘍組織を含む対照試料中の前記複数の発現遺伝子または該遺伝子によってコードされる遺伝子産物の量を検出する工程であって、その発現遺伝子がＳ１００Ａ１０、Ｓ１００Ａ１１、カルパイン２、ＳＰＡＲＣ、ＭｅｔＡＰ２、ＫＬＫ６、ＡＲＡ９、カルポニン２、ＲＮＰＳ１、ｅＩＦ５、ｅＩＦ２Ｂε、ＨＳＦ２、ＷＤＲ１、フューズドトウ（Ｆｕｓｅｄ　ｔｏｅｓ）、ＮＭ２３Ｄ、ＡＤＡＲ１、グランカルシン、ＮＢＲ１、ＳＡＰＫ／Ｅｒｋ１、亜鉛フィンガータンパク質－２６２ＭＹＭ、ＨＹＡ２２、ＭＲＰＬ４、ビネキシンβ、Ｇ－ＣＳＦＲ、ＩＧＦＢＰ－７、ＦＡＳＴキナーゼ、ＴＥＳＫ２、ＳＲＢ１、またはＫＩＡＡ００８２である工程、ならびに、（ｃ）工程（ａ）で測定された発現遺伝子または遺伝子産物の量を工程（ｂ）で測定された発現遺伝子または遺伝子産物の量と比較する工程からなり、工程（ａ）で検出される量が工程（ｂ）で検出される量より少なくとも２０％多い場合は、その患者が化学療法に対して抵抗性であると予測される方法である。本明細書で提示するように、工程（ａ）で検出される量が工程（ｂ）で検出される量より少なくとも２０％多い複数の前記遺伝子は、化学療法薬に対して抵抗性である腫瘍試料に特異的な遺伝子発現パターンを定義づける。特定の態様では、対照試料は化学療法

に反応性のがん患者から得た生物試料である。好ましくは、１または複数の前記遺伝子の発現は、工程（ｂ）で検出される対照試料よりも、工程（ａ）で検出される腫瘍試料において多い。好ましい実施形態では、動物はヒトであり、最も好ましくはヒトのがん患者である。本明細書で開示するように、本発明はさらに、遺伝子発現パターンであって、該パターンが検出されたときに前記化学療法薬に対する抵抗性が予測される遺伝子発現パターンも提供する。好ましい実施形態では、特に、本明細書で特定する複数の遺伝子産物に特異的な核酸（遺伝子）プローブまたは抗体のアレイを用いて生物試料を分析することによって、遺伝子発現を検出する。

【００２５】

都合のよいことに、本明細書で特定するいくつかの遺伝子は、これまで卵巣がんまたは結腸がんのいずれにも関連が認識されたことはなく、これらの疾患を治療処置するための新規な標的となる可能性がある。

【００２６】

本発明の具体的な好ましい実施形態は、特定の好ましい実施形態に関する以下のより詳細な記述および特許請求の範囲から明らかになるであろう。

【発明を実施するための最良の形態】

【００２７】

本発明は、腫瘍細胞の増殖を抑制、遅延、または防止する方法を提供し、該方法は、腫瘍細胞を、その細胞が抵抗性を有する濃度の化学療法薬の存在下で、１または複数の表１に示す細胞遺伝子の発現または活性を修飾する少なくとも１種の修飾因子に接触させる工程からなり、腫瘍細胞を前記遺伝子発現修飾因子に接触させることにより腫瘍細胞の薬物抵抗性が低減、抑制、遅延、または防止される。腫瘍細胞は、例えば、卵巣がんでよい。１実施形態では、腫瘍細胞は、ｉｎ　ｖｉｖｏで（例えば、患者から取り出されていない細胞として）接触させてよい。

【００２８】

本明細書では、「生物試料」という用語は、それだけには限らないが、動物、好ましくは哺乳動物、最も好ましくはヒトから得た組織または体液を含む。例えば、生物試料は、生検材料、骨髄試料、血液、血漿、血清、もしくはそれらの細胞画分、尿、唾液、涙、または生物供給源に由来する細胞でよい。１実施形態では、哺乳動物は、がん、特に卵巣がんまたは結腸がんに罹患していることが疑われるヒト、または、罹患していると以前に診断されたヒト、あるいは、それらのがんについてスクリーニングする必要があるヒトである。いくつかの実施形態では、生物試料は腫瘍試料である。

【００２９】

本明細書では、「卵巣がん」という用語は、一般に上皮性卵巣がんを意味するものと理解されたい。上皮性卵巣がんは、卵巣組織に由来する全ての診断されたヒトのがんの約８０％を占める。生殖細胞系由来の卵巣がんおよび卵巣明細胞がんを含む残りのがんは稀であり、しばしば誤診される。本明細書で開示する遺伝子発現の変化がこれら少数派の腫瘍のタイプでも認められる場合は、本発明の方法および組成物はそれらに適用される。

【００３０】

本明細書では、遺伝子発現または遺伝子産物の活性の「修飾因子」は、遺伝子発現または遺伝子産物の活性を増大または低減させることができる任意の化学化合物、核酸分子、ペプチド、またはポリペプチドでよい。いくつかの実施形態では、本発明の修飾因子は、化学療法剤に対して抵抗性である腫瘍細胞において発現または活性が低減される１または複数の細胞遺伝子の発現または活性を増大させる化合物であり、このような修飾因子を本明細書では「活性化因子」と呼ぶ。他の実施形態では、修飾因子は、１または複数の細胞遺伝子、特に、化学療法剤に対して抵抗性である腫瘍細胞において発現が増大される遺伝子の発現または活性の阻害因子であり、このような修飾因子を本明細書では「阻害因子」と呼ぶ。

【００３１】

本明細書では、「阻害因子」は、遺伝子産物の活性を低減させ、または遺伝子の発現を

直接阻害することができる、任意の化学化合物、核酸分子、ペプチド、または遺伝子産物に対する抗体などのポリペプチドでよい。本発明の阻害因子は、例えば、遺伝子にコードされているタンパク質の活性を直接的または間接的に阻害することができる。直接的な阻害は、例えば、タンパク質に結合し、該結合によりそのタンパク質が受容体など所期の標的に結合するのを防ぐことによって達成されうる。間接的な阻害は、例えば、受容体や結合相手などタンパク質の所期の標的に結合し、該結合によりそのタンパク質の活性を妨害または低減させることによって達成されうる。さらに、本発明の阻害因子は遺伝子の発現を低減または抑制することにより、特に、遺伝子発現（転写、プロセッシング、翻訳、翻訳後修飾）に干渉することにより、例えば、遺伝子のｍＲＮＡに干渉し、その遺伝子産物の翻訳を妨害することによって、または遺伝子産物の翻訳後修飾によって、あるいは、細胞内局在の変化を引き起こすことによって、遺伝子を阻害することもできる。

【００３２】

本明細書では、「活性化因子」は、（例えば、遺伝子産物を安定化させること、遺伝子産物のタンパク質分解を防止すること、または、遺伝子産物の酵素活性もしくは結合活性を増大させること、あるいは遺伝子発現を直接活性化することによって）、遺伝子産物の活性を増大させることができる、任意の化学化合物、核酸分子、ペプチド、またはポリペプチドでよい。本発明の活性化因子は、遺伝子にコードされているタンパク質の活性を直接的または間接的に増大させることができる。直接的な活性化は、例えば、タンパク質に結合し、それによりそのタンパク質が受容体など所期の標的に結合するのを促進することによって達成されうる。間接的な活性化は、例えば、受容体や結合相手などタンパク質の所期の標的に結合し、活性を増大させる、例えば、その標的の有効濃度を高めることによって達成されうる。さらに、本発明の活性化因子は、遺伝子の発現を増大させることにより、例えば、遺伝子発現（転写、プロセッシング、翻訳、翻訳後修飾）を増大させることにより、例えば、遺伝子のｍＲＮＡを安定化し、もしくは、そのｍＲＮＡ転写物の分解を妨害することによって、または遺伝子産物の翻訳後修飾によって、あるいは、細胞内局在の変化を引き起こすことによって、遺伝子を活性化することができる。

【００３３】

本明細書で記述するように、化学療法抵抗性の卵巣腫瘍細胞におけるいくつかの遺伝子の発現は、化学療法感受性の卵巣腫瘍細胞における該遺伝子の発現と実質的に異なる。表１は、以下の実施例で記述する方法を用いて同定したそれらの遺伝子のリストを提供する。この表には、幅広く使用される化学療法剤であるシスプラチンに対して感受性または抵抗性の細胞における、これらの遺伝子の発現パターンもまとめて示す。

【００３４】

【表１】

表1

GenBank 登録番号	名称	染色体位置	タンパク質情報	細胞株で検証された発現パターン
BC015973	S100A10 p11 CLP11 カルパクチン1 軽鎖 42C	**1q21.3**	細胞外 96アミノ酸	シスプラチン抵抗性の増大とともに上昇
BC001410	S100A11 S100C カルギザリン	**1q21.3**	細胞外 105アミノ酸	シスプラチン抵抗性の増大とともに上昇
AF261089	カルパイン2 CANPL2 MCANP	1q41-q42.11	細胞質及び 細胞膜 700アミノ酸	シスプラチン抵抗性の増大とともに上昇
BC004974	SPARC オステオネクチン BM-40	5q31.3- q33.1	細胞外 303アミノ酸	シスプラチン抵抗性の増大とともに上昇
BC013782	MetAP2 p67eIF2 MNPEP	12q22	細胞質 478アミノ酸	シスプラチン抵抗性の増大とともに上昇
BC015525	KLK6 ザイム ニューロシン プロテアーゼM	**19q13.33**	細胞外 244アミノ酸	シスプラチン抵抗性の増大とともに上昇
AF222689	HMT1 HMT2 ANM1 HCP1	**19q13.33**	核 361アミノ酸	シスプラチン抵抗性の増大とともに低下
U31913	ARA9 XAP2	**11q13.3**	細胞質 330アミノ酸	シスプラチン抵抗性の増大とともに上昇
D83735	カルポニン2	**19p13.3**	細胞質 309アミノ酸	シスプラチン抵抗性の増大とともに上昇
U19251	NAIP	5q13.1-13.2	細胞質 1403アミノ酸	シスプラチン抵抗性の増大とともに低下
BC005291	eEF1ε p18	6p24.3- p25.1	細胞質 174アミノ酸	シスプラチン抵抗性の増大とともに低下
AF015608	RNPS1	16p13.3	細胞質	シスプラチン抵抗性の増大とともに上昇
U49436	eIF5	14q32.32	細胞質	シスプラチン抵抗性の増大とともに上昇

GenBank 登録番号	名称	染色体位置	タンパク質情報	細胞株で検証された発現パターン
	eIF5A		431アミノ酸	
BC013590	eIF2Bε	3q27.1	細胞質 721アミノ酸	シスプラチン抵抗性の増大とともに上昇
M65217	HSF2 HSTF2	6q22.31	細胞質および核 536アミノ酸	シスプラチン抵抗性の増大とともに上昇
AB010427	WDR1 NORI-1	4p16.1	細胞質 606アミノ酸	シスプラチン抵抗性の増大とともに上昇
BC001134	フューズドトウ (Ft1)	16q12.2	未知 292アミノ酸	シスプラチン抵抗性の増大とともに上昇
BC004880	NM23D mn23-H4	16p13.3	ミトコンドリアの膜間腔 187アミノ酸	シスプラチン抵抗性の増大とともに上昇
U10439	ADAR1	**1q21.1-q21.2**	核 1226アミノ酸	シスプラチン抵抗性の増大とともに上昇
BC005214	グランカルシン	2q24.2	細胞質／膜 217アミノ酸	シスプラチン抵抗性の増大とともに上昇
BC009808	NBR1	**17q21.1-q21.31**	966アミノ酸	シスプラチン抵抗性の増大とともに上昇
L36870	SAPK/Erk1 JNKK1 MEK4 MKK4 MAPKK4	17p11.2-p12	細胞質 399アミノ酸	シスプラチン抵抗性の増大とともに上昇
AB007885	亜鉛フィンガータンパク質－262 MYM	1p32-p34.3	未知	シスプラチン抵抗性の増大とともに上昇

GenBank 登録番号	名称	染色体位置	タンパク質情報	細胞株で検証された発現パターン
D88153	HYA22	**3p21.3**	未知	シスプラチン抵抗性の増大とともに上昇
AB049635	MRPL4 CGI-28	**19p13.2**	ミトコンドリア	シスプラチン抵抗性の増大とともに上昇
AF037261	ビネキシンβ	**8p21.3**	細胞骨格に結合	シスプラチン抵抗性の増大とともに上昇
M59818	G-CSFR	1p35-34.3	細胞膜または可溶形態 836アミノ酸	シスプラチン抵抗性の増大とともに上昇
BC015710	RAB22A	20q13.32	膜に結合 194アミノ酸	シスプラチン抵抗性の増大とともに低下
BC017201	IGFBP-7 MAC25 FSTL2	4q12	分泌型 282アミノ酸	シスプラチン抵抗性の増大とともに上昇
BC011770	FASTキナーゼ	7q36.1	細胞質 549アミノ酸	シスプラチン抵抗性の増大とともに上昇
AB057597	TESK2	1p34.1	核／細胞骨格に結合	シスプラチン抵抗性の増大とともに上昇
BC022087	SRB1 CLA1 CD36L1	**12q24.31**	細胞膜	シスプラチン抵抗性の増大とともに上昇
BC031890	KIAA0082	6p21.1	未知 836アミノ酸	シスプラチン抵抗性の増大とともに上昇
NM_006312	NCOR2	**12q24**	核 2517アミノ酸	シスプラチン抵抗性の増大とともに低下
BC032338	MT1	16q13	主に核、分泌も可	シスプラチン抵抗性の増大とともに低下
X98494	MPP10	2p12-2p13.2	主に細胞質、分泌も可	シスプラチン抵抗性の増大とともに低下

表１において太字で表されている染色体位置は、卵巣がんに関連していることが報告されている（ペジョイク（Ｐｅｊｏｉｃ）、１９９５年、Ａｎｎ．Ｍｅｄ．第２７巻、７３～７８ページ）。

【００３５】

１実施形態では、表１に示す細胞遺伝子の阻害因子は、例えば、小分子阻害因子、抗体、アンチセンス核酸などの核酸、低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）分子、またはショートヘアピンＲＮＡ（ｓｈＲＮＡ）分子でよい。さらに、このような阻害因子は、本明細書で

記述する方法または当技術分野で公知の方法を用いて特異的に設計することもできる。例えば、表１に示す遺伝子によってコードされるタンパク質に対する抗体、特に中和抗体、好ましくはモノクローナル抗体を、例えば、本願明細書に援用するハーロウ（Ｈａｒｌｏｗ）およびレーン（Ｌａｎｅ）による「Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ」（コールドスプリングハーバー出版（Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｐｒｅｓｓ）、１９８８年）に記載されている従来手段によって作製することができる。

【００３６】

特定の実施形態では、本発明の阻害因子は、表１に示す遺伝子である標的遺伝子をコードするｍＲＮＡに結合するｓｉＲＮＡである。

好ましい実施形態では、本発明により提供されるいくつかの阻害因子は、低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）の種類である。「低分子干渉ＲＮＡ」または「ｓｉＲＮＡ」という用語は、本明細書では、例えば、バス（Ｂａｓｓ）、２００１年、Ｎａｔｕｒｅ 第４１１巻、４２８～４２９ページ；エルバシールら（Ｅｌｂａｓｈｉｒ ｅｔ ａｌ．）２００１年、Ｎａｔｕｒｅ 第４１１巻、４９４～４９８ページ；クロイツェルら（Ｋｒｅｕｔｚｅｒ ｅｔ ａｌ．）、国際公開公報第００／４４８９５号パンフレット；ゼルニッカ－ゴーツら（Ｚｅｒｎｉｃｋａ－Ｇｏｅｔｚ ｅｔ ａｌ．）、国際公開公報第０１／３６６４６号パンフレット；ファイア（Ｆｉｒｅ）、国際公開公報第９９／３２６１９号パンフレット；プラエティンクら（Ｐｌａｅｔｉｎｃｋ ｅｔ ａｌ．）、国際公開公報第００／０１８４６号パンフレット；メローおよびファイア（Ｍｅｌｌｏ ａｎｄ Ｆｉｒｅ）、国際公開公報第０１／２９０５８号パンフレット；デシャン－デパイレツト（Ｄｅｓｃｈａｍｐｓ－Ｄｅｐａｉｌｌｅｔｔｅ）、国際公開公報第９９／０７４０９号パンフレット、ならびに、リら（Ｌｉ ｅｔ ａｌ．）、国際公開公報第００／４４９１４号パンフレットで開示されているように、ＲＮＡ干渉、すなわち「ＲＮＡｉ」の能力を有する２本鎖核酸分子を意味する。本明細書では、ｓｉＲＮＡ分子は、ＲＮＡのみを含むこれらの分子に限定される必要はなく、ＲＮＡｉの能力または活性を有する化学的に改変されたヌクレオチドおよび非ヌクレオチドもさらに包含する。

【００３７】

低分子干渉ＲＮＡを媒介としたＲＮＡｉは、様々な系で研究されている。ファイアら（Ｆｉｒｅ ｅｔ ａｌ．）は、線虫（Ｃ．ｅｌｅｇａｎｓ）におけるＲＮＡｉを最初に観察した（１９９８年、Ｎａｔｕｒｅ 第３９１巻、８０６ページ）。ウィアニー（Ｗｉａｎｎｙ）およびゴーツ（Ｇｏｅｔｚ）は、マウス胚でのｄｓＲＮＡによって媒介されるＲＮＡｉについて記述している（１９９９年、Ｎａｔｕｒｅ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ．第２巻、７０ページ）。ハモンドら（Ｈａｍｍｏｎｄ ｅｔ ａｌ．）は、ｄｓＲＮＡでトランスフェクションしたショウジョウバエ細胞でのＲＮＡｉについて記述している（２０００年、Ｎａｔｕｒｅ 第４０４巻、２９３ページ）。エルバシールら（Ｅｌｂａｓｈｉｒ ｅｔ ａｌ．）は、ヒト胚性腎臓細胞およびＨｅＬａ細胞などの培養した哺乳動物細胞に２１ヌクレオチドの合成ＲＮＡの２重鎖を導入することによって誘導されるＲＮＡｉについて記述している（２００１年、Ｎａｔｕｒｅ 第４１１巻、４９４ページ）。これらの研究は、２１ヌクレオチドからなるｓｉＲＮＡ２重鎖が、２ヌクレオチドの３’オーバーハングを含むときに最も高活性であることを示した。さらに、ｓｉＲＮＡの１方または双方の鎖を２’－デオキシヌクレオチドまたは２’－Ｏ－メチルヌクレオチドで置換するとＲＮＡｉ活性が失われるが、ｓｉＲＮＡの３’末端ヌクレオチドをデオキシヌクレオチドで置換することは許容されることが示された。ｓｉＲＮＡ２重鎖の中央部にミスマッチ配列があっても、ＲＮＡｉ活性を無効にすることが示された。さらに、これらの研究は、標的ＲＮＡの切断部位の位置が、ｓｉＲＮＡガイド配列の３’末端ではなく５’末端によって定められていることも示している（エルバシールら（Ｅｌｂａｓｈｉｒ ｅｔ ａｌ．）、２００１年、ＥＭＢＯ Ｊ．第２０巻、６８７７ページ）。他の研究は、ｓｉＲＮＡ２重鎖の標的に相補的な鎖上の５’リン酸がｓｉＲＮＡ活性に必要であること、およびそのｓｉＲＮＡ上の５’リン酸部分を維持するために細胞中でＡＴＰが利用されることを示

した。（ニッカネン（Ｎｙｋａｎｅｎ　ｅｔ　ａｌ．）、２００１年、Ｃｅｌｌ　第１０７巻、３０９ページ）。しかし、５’リン酸を欠いているｓｉＲＮＡ分子を外因的に導入すると活性を有しており、これは、ｓｉＲＮＡ構築物の５’リン酸化がｉｎ　ｖｉｖｏで起こり得ることを示唆している。一部の応用例では、化学的に改変したｓｉＲＮＡを血流に直接注入することができる。

【００３８】

いくつかの実施形態では、本発明は、本発明の少なくとも１種のｓｉＲＮＡ分子をコードする核酸配列を、ｓｉＲＮＡ分子の発現が可能な方式で含む発現ベクターを提供する。例えば、このベクターは、２重鎖を含むｓｉＲＮＡ分子の双方の鎖をコードする配列を含むことができる。ベクターが、自己相補的であり、したがってｓｉＲＮＡ分子を形成する単一の核酸分子をコードする配列を含んでいてもよい。このような発現ベクターの非限定的な例は、ポールら（Ｐａｕｌ　ｅｔ　ａｌ．）２００２年、Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　第１９巻、５０５ページ；宮岸および多比良（Ｍｉｙａｇｉｓｈｉ　ａｎｄ　Ｔａｉｒａ）、２００２年、Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　第１９巻、４９７ページ；リーら（Ｌｅｅ　ｅｔ　ａｌ．）、２００２年、Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　第１９巻、５００ページ；ならびにノビナら（Ｎｏｖｉｎａ　ｅｔ　ａｌ．）、２００２年、Ｎａｔｕｒｅ　Ｍｅｄｉｃｉｎｅ、オンライン出版、２００３年６月３日に記載されている。

【００３９】

いくつかの実施形態では、本発明によるｓｉＲＮＡ分子は、特にリポソームなど、被験者に投与するための送達ビヒクル、担体および希釈剤ならびにそれらの塩を含んでよく、また、薬剤組成物中に存在してよい。核酸分子を送達するための方法は、例えば、アクタルら（Ａｋｈｔａｒ　ｅｔ　ａｌ．）、１９９２年、Ｔｒｅｎｄｓ　Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏ．第２巻、１３９ページ；Ｄｅｌｉｖｅｒｙ　Ｓｔｒａｔｅｇｉｅｓ　ｆｏｒ　Ａｎｔｉｓｅｎｓｅ　Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ　Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ、アクタル（Ａｋｈｔａｒ）編、１９９５年；マウラーら（Ｍａｕｒｅｒ　ｅｔ　ａｌ．）、１９９９年、Ｍｏｌ．Ｍｅｍｂｒ．Ｂｉｏｌ．第１６巻、１２９～１４０ページ；ホフランドおよびファン（Ｈｏｆｌａｎｄ　ａｎｄ　Ｈｕａｎｇ）、１９９９年、Ｈａｎｄｂ．Ｅｘｐ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．第１３７巻、１６５～１９２ページ；ならびにリーら（Ｌｅｅ　ｅｔ　ａｌ．）、２０００年、ＡＣＳ　Ｓｙｍｐ．Ｓｅｒ．第７５２巻、１８４～１９２ページに記載されており、これら全てを本願明細書に援用する。ベイグルマンら（Ｂｅｉｇｅｌｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．）の米国特許第６３９５７１３号およびサリバンら（Ｓｕｌｌｉｖａｎ　ｅｔ　ａｌ．）の国際公開公報第９４／０２５９５号パンフレットは、核酸分子を送達するための一般的な方法をさらに記載している。これらのプロトコールは、実質的にどんな核酸分子を送達するのにも利用することができる。核酸分子は、それだけには限らないが、リポソームへの封入、イオン浸透法、または、ヒドロゲル、シクロデキストリン、生分解性のナノカプセル、および生体接着性ミクロスフェアなど他の送達ビヒクル中への組み込み、あるいは、タンパク質性のベクター（例えば、オヘアおよびノルマン（Ｏ’Ｈａｒｅ　ａｎｄ　Ｎｏｒｍａｎｄ）、国際公開公報第００／５３７２２号パンフレットを参照のこと）など、当業者に公知の様々な方法によって細胞に投与することができる。

【００４０】

あるいは、直接注射することによって、または薬剤注入ポンプを使用することによって、核酸／ビヒクルの組合せを局所的に送達させることができる。本発明の核酸分子の直接注射は、皮下であれ、筋肉内であれ、皮内であれ、標準の針とシリンジによる方法を用いても、コンリーら（Ｃｏｎｒｙ　ｅｔ　ａｌ．）、１９９９年、Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．第５巻、２３３０～２３３７ページ、およびバリーら（Ｂａｒｒｙ　ｅｔ　ａｌ．）、国際公開公報第９９／３１２６２号パンフレットに記載されている方法などの無針技術によっても行うことができる。当技術分野の多くの実施例により、浸透圧ポンプ（チュンら（Ｃｈｕｎ　ｅｔ　ａｌ．）、１９９８年、Ｎｅｕｒｏｓｃｉｅｎｃｅ　Ｌｅｔ

ｔｅｒｓ 第２５７巻、１３５～１３８頁；ダルディンら（Ｄ’Ａｌｄｉｎ ｅｔ ａｌ．）、１９９８年、Ｍｏｌ．Ｂｒａｉｎ Ｒｅｓｅａｒｃｈ 第５５巻、１５１～１６４ページ；ドライデンら（Ｄｒｙｄｅｎ ｅｔ ａｌ．）、１９９８年、Ｊ．Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ．第１５７巻、１６９～１７５ページ；ギルニカルら（Ｇｈｉｒｎｉｋａｒ ｅｔ ａｌ．）、１９９８年、Ｎｅｕｒｏｓｃｉｅｎｃｅ Ｌｅｔｔｅｒｓ 第２４７巻、２１～２４ページ）、または直接注入（ブローダスら（Ｂｒｏａｄｄｕｓ ｅｔ ａｌ．）、１９９７年、Ｎｅｕｒｏｓｕｒｇ．Ｆｏｃｕｓ 第３巻、第４論文）によるオリゴヌクレオチドの送達方法が記載されている。他の送達経路としては、それだけには限らないが、経口送達（錠剤または丸剤の形態などで）および／または髄腔内送達（ゴールド（Ｇｏｌｄ）、１９９７年、Ｎｅｕｒｏｓｃｉｅｎｃｅ 第７６巻、１１５３～１１５８ページ）が挙げられる。核酸の送達および投与に関するより詳細な記述は、サリバンら（Ｓｕｌｌｉｖａｎ ｅｔ ａｌ．）による国際公開公報第９４／０２５９５号パンフレット、ドラパーら（Ｄｒａｐｅｒ ｅｔ ａｌ．）による国際公開公報第９３／２３５６９号パンフレット、ベイグルマンら（Ｂｅｉｇｅｌｍａｎ ｅｔ ａｌ．）による国際公開公報第９９／０５０９４号パンフレット、およびクリムクら（Ｋｌｉｍｕｋ ｅｔ ａｌ．）による国際公開公報第９９／０４８１９号パンフレットに提供されており、これら全てを本願明細書に援用する。

【００４１】

あるいは、本発明のある種のｓｉＲＮＡ分子を、細胞内部で真核生物プロモーターから発現させることができる（例えば、アイザントおよびウェイントローブ（Ｉｚａｎｔ ａｎｄ Ｗｅｉｎｔｒａｕｂ）、１９８５年、Ｓｃｉｅｎｃｅ 第２２９巻、３４５ページ；マクギャリーおよびリンドキスト（ＭｃＧａｒｒｙ ａｎｄ Ｌｉｎｄｑｕｉｓｔ）、１９８６年、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．，ＵＳＡ 第８３巻、３９９ページ；スキャンロンら（Ｓｃａｎｌｏｎ ｅｔ ａｌ．）、１９９１年、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ 第８８巻、１０５９１～５ページ；カシャニ－サベットら（Ｋａｓｈａｎｉ－Ｓａｂｅｔ ｅｔ ａｌ．）、１９９２年、Ａｎｔｉｓｅｎｓｅ Ｒｅｓ．Ｄｅｖ．第２巻、３～１５ページ；ドロプリックら（Ｄｒｏｐｕｌｉｃ ｅｔ ａｌ．）、１９９２年、Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．第６６巻、１４３２～４１ページ；ウィーラシンゲら（Ｗｅｅｒａｓｉｎｇｈｅ ｅｔ ａｌ．）、１９９１年、Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．第６５巻、５５３１～４ページ：オジャングら（Ｏｊｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．）、１９９２年、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ 第８９巻、１０８０２～６ページ；チェンら（Ｃｈｅｎ ｅｔ ａｌ．）、１９９２年、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．第２０巻、４５８１～９ページ；サーバーら（Ｓａｒｖｅｒ ｅｔ ａｌ．）、１９９０年、Ｓｃｉｅｎｃｅ 第２４７巻、１２２２～１２２５ページ；トンプソンら（Ｔｈｏｍｐｓｏｎ ｅｔ ａｌ．）、１９９５年、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．第２３巻、２２５９ページ；グッドら（Ｇｏｏｄ ｅｔ ａｌ．）、１９９７年、Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ 第４巻、４５ページ；宮岸ら（Ｍｉｙａｇｉｓｈｉ ｅｔ ａｌ．）、２００１年、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ 第２９巻、２５０２ページ；ならびにクンケルおよびピーダースン（Ｋｕｎｋｅｌ ａｎｄ Ｐｅｄｅｒｓｏｎ）、１９８９年、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ 第１７巻、７３７１ページを参照のこと）。適切なＤＮＡ／ＲＮＡベクターを用いて、真核細胞中で任意の核酸を発現することができることは、当業者には認識されよう。このような核酸の活性は、該核酸を核酸酵素によって一次転写物から遊離させることにより増強することができる（ドレイパーら（Ｄｒａｐｅｒ ｅｔ ａｌ．）国際公開公報第９３／２３５６９号パンフレット；サリバンら（Ｓｕｌｌｉｖａｎ ｅｔ ａｌ．）国際公開公報第９４／０２５９５号パンフレット；大川ら（Ｏｈｋａｗａ ｅｔ ａｌ．）、１９９２年、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｓｙｍｐ．Ｓｅｒ．第２７巻、１５～６ページ；多比良ら（Ｔａｉｒａ ｅｔ ａｌ．）、１９９１年、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．第１９巻、５１２５～３０ページ；ベンチュラら（Ｖｅｎｔｕｒａ ｅｔ ａｌ．）、１９９３年、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．第２１巻、３２４９～５５ページ；チョーリラら（Ｃ

ｈｏｗｒｉｒａ　ｅｔ　ａｌ．）、１９９４年、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．第２６９巻、２５８５６ページ）。

【００４２】

本発明の別の態様では、本発明のＲＮＡ分子は、ＤＮＡベクターまたはＲＮＡベクター中に挿入された転写単位（例えば、クチュールら（Ｃｏｕｔｕｒｅ　ｅｔ　ａｌ．）、１９９６年、ＴＩＧ　第１２巻、５１０ページを参照のこと）から発現させることができる。これらの組換えベクターは、ＤＮＡプラスミドでもウイルスベクターでもよい。ｓｉＲＮＡを発現するウイルスベクターは、例えば、それだけには限らないが、アデノ随伴ウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、レンチウイルス、またはアルファウイルスをベースとして構築することができる。別の実施形態では、ｐｏｌ　ＩＩＩベースの構築物を用いて、本発明の核酸分子を発現させる（例えば、トンプソン（Ｔｈｏｍｐｓｏｎ）、米国特許第５９０２８８０号および同第６１４６８８６号を参照のこと）。ｓｉＲＮＡ分子を発現することができる組換えベクターは、前述したように送達され、標的細胞中に存在し続けてもよい。あるいは、核酸分子の一過性発現を提供するウイルスベクターを使用することもできる。このようなベクターは、必要に応じて繰り返し投与することができる。発現されると、ｓｉＲＮＡ分子は標的ｍＲＮＡと相互に作用し、ＲＮＡｉ反応が生じる。ｓｉＲＮＡ分子発現ベクターの送達は、静脈内投与もしくは筋肉内投与によって、被験者から取り出した標的細胞に投与した後、被験者に該細胞を再導入することによって、または所望の標的細胞中への導入を可能にすると考えられる他の任意の手段によってなど、全身的に行うことができる（総説は、例えば、クチュールら（Ｃｏｕｔｕｒｅ　ｅｔ　ａｌ．）、１９９６年、ＴＩＧ．第１２巻、５１０ページを参照のこと）。

【００４３】

１実施形態では、本発明は、少なくとも１種の本発明のｓｉＲＮＡ分子をコードする核酸配列を含む発現ベクターを提供する。この発現ベクターは、ｓｉＲＮＡ２重鎖の一方もしくは双方の鎖をコードするものでもよいし、または、自己ハイブリダイズしてｓｉＲＮＡ２重鎖となる単一の自己相補鎖をコードしてもよい。ｓｉＲＮＡ分子をコードしている核酸配列は、ｓｉＲＮＡ分子の発現を可能にする方式で、作動可能なように連結させることができる（例えば、ポールら（Ｐａｕｌ　ｅｔ　ａｌ．）、２００２年、Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　第１９巻、５０５ページ；宮岸および多比良（Ｍｉｙａｇｉｓｈｉ　ａｎｄ　Ｔａｉｒａ）、２００２年、Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　第１９巻、４９７ページ；リーら（Ｌｅｅ　ｅｔ　ａｌ．）、２００２年、Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　第１９巻、５００ページ；ならびにノビナら（Ｎｏｖｉｎａ　ｅｔ　ａｌ．）、２００２年、Ｎａｔｕｒｅ　Ｍｅｄｉｃｉｎｅ、オンライン出版、６月３日を参照のこと）。本明細書では、「作動可能なように連結される」という用語は、そのように記述されるフランキング配列が通常の機能を果たすように構成または組み立てられている、フランキング配列の配置を意味する。したがって、コード配列に作動可能なように連結したフランキング配列は、コード配列の複製、転写、および／または翻訳を実施することができることになるであろう。例えば、プロモーターがコード配列の転写を指示することができるとき、コード配列はそのプロモーターに作動可能なように連結している。フランキング配列は、正しく機能する限り、コード配列に連続的である必要はない。したがって、例えば、翻訳されないが転写される介在配列がプロモーター配列とコード配列の間に存在してもよく、このようなプロモーター配列もコード配列に「作動可能なように連結している」とみなすことができる。

【００４４】

別の態様では、本発明は発現ベクターを提供し、該発現ベクターは、ａ）転写開始領域（例えば、真核生物のｐｏｌ　Ｉ、ＩＩ、またはＩＩＩ開始領域）、ｂ）転写終結領域（例えば、真核生物のｐｏｌ　Ｉ、ＩＩ、またはＩＩＩ終結領域）、ならびにｃ）本発明のｓｉＲＮＡ分子のうちの少なくとも１種をコードしている核酸配列を含み、前記配列が、ｓｉＲＮＡ分子の発現および／または送達を可能にする方式で前記開始領域および前記終結領域に作動可能なように連結している。このベクターは、本発明のｓｉＲＮＡをコード

する配列の５’側もしくは３’側に作動可能なように連結された、タンパク質のオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）、および／またはイントロン（介在配列）を任意選択で含んでよい。

【００４５】

ｓｉＲＮＡ分子配列の転写は、真核生物のＲＮＡポリメラーゼＩ（ｐｏｌ　Ｉ）、ＲＮＡポリメラーゼＩＩ（ｐｏｌ　ＩＩ）、またはＲＮＡポリメラーゼＩＩＩ（ｐｏｌ　ＩＩＩ）のプロモーターから駆動することができる。ｐｏｌ　ＩＩまたはｐｏｌ　ＩＩＩプロモーターからの転写物は、全ての細胞において高レベルで発現されるが；ある種の細胞における所与のｐｏｌ　ＩＩプロモーターのレベルは、近隣に存在する遺伝子調節配列（エンハンサー、サイレンサーなど）の性質に応じて変わる。原核生物のＲＮＡポリメラーゼ酵素が適切な細胞で発現される場合には、原核生物のＲＮＡポリメラーゼプロモーターも使用される（エルロイ－ステインおよびモス（Ｅｌｒｏｙ－Ｓｔｅｉｎ　ａｎｄ　Ｍｏｓｓ）、１９９０年、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　第８７巻、６７４３～７ページ；ギャオおよびファン（Ｇａｏ　ａｎｄ　Ｈｕａｎｇ）１９９３年、Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．第２１巻、２８６７～７２ページ；リーバーら（Ｌｉｅｂｅｒ　ｅｔ　ａｌ．）、１９９３年、Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｅｎｚｙｍｏｌ．第２１７巻、４７～６６ページ；ジョウら（Ｚｈｏｕ　ｅｔ　ａｌ．）、１９９０年、Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．第１０巻、４５２９～３７ページ）。数人の研究者が、これらのプロモーターから発現される核酸分子が哺乳動物細胞中で機能できることを実証している（例えば、カシャニ－サベットら（Ｋａｓｈａｎｉ－Ｓａｂｅｔ　ｅｔ　ａｌ．）、１９９２年、Ａｎｔｉｓｅｎｓｅ　Ｒｅｓ．Ｄｅｖ．第２巻、３～１５ページ；オジャングら（Ｏｊｗａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．）、１９９２年、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　第８９巻、１０８０２～６ページ；チェンら（Ｃｈｅｎ　ｅｔ　ａｌ．）、１９９２年、Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．第２０巻、４５８１～９ページ；ユら（Ｙｕ　ｅｔ　ａｌ．）、１９９３年、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　第９０巻、６３４０～４ページ；リューリェら（Ｌ’Ｈｕｉｌｌｉｅｒ　ｅｔ　ａｌ．）、１９９２年、ＥＭＢＯ　Ｊ．第１１巻、４４１１～８ページ；リスジーウィッツら（Ｌｉｓｚｉｅｗｉｃｚ　ｅｔ　ａｌ．）、１９９３年、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ　第９０巻、８０００～４ページ；トンプソンら（Ｔｈｏｍｐｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．）、１９９５年、Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．第２３巻、２２５９ページ；サレンジャーおよびチェフら（Ｓｕｌｌｅｎｇｅｒ　ａｎｄ　Ｃｅｃｈ）、１９９３年、Ｓｃｉｅｎｃｅ　第２６２巻、１５６６ページ）。より詳細には、Ｕ６低分子核内（ｓｎＲＮＡ）、転移ＲＮＡ（ｔＲＮＡ）、およびアデノウイルスＶＡ　ＲＮＡをコードする遺伝子に由来するものなどの転写単位は、細胞でｓｉＲＮＡなど所望のＲＮＡ分子を高濃度で生じさせるのに有用である（トンプソンら（Ｔｈｏｍｐｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．）、１９９５年、Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．第２３巻、２２５９ページ；クチュールら（Ｃｏｕｔｕｒｅ　ｅｔ　ａｌ．）、１９９６年、ＴＩＧ　第１２巻、５１０ページ；ヌーンバーグら（Ｎｏｏｎｂｅｒｇ　ｅｔ　ａｌ．）、１９９４年、Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄ　Ｒｅｓ．第２２巻、２８３０ページ；ヌーンバーグら（Ｎｏｏｎｂｅｒｇ　ｅｔ　ａｌ．）、米国特許第５６２４８０３号；グッドら（Ｇｏｏｄ　ｅｔ　ａｌ．）、１９９７年、Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒ．第４巻、４５ページ；ベイグルマンら（Ｂｅｉｇｅｌｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．）、国際公開公報第９６／１８７３６号パンフレット）。上記のｓｉＲＮＡ転写単位は、それだけには限らないが、プラスミドＤＮＡベクター、ウイルスＤＮＡベクター（アデノウイルスベクターやアデノ随伴ウイルスベクターなど）、またはウイルスＲＮＡベクター（レトロウイルスベクターやアルファウイルスベクターなど；総説は、クチュールら（Ｃｏｕｔｕｒｅ　ｅｔ　ａｌ．）、１９９６年、ＴＩＧ　第１２巻、５１０ページを参照のこと）などの、哺乳動物の細胞中に導入するための様々なベクター中に組み入れることができる。

【００４６】

別の実施形態では、本発明は、本発明のｓｉＲＮＡ分子のうちの少なくとも１種をコー

ドする核酸配列を、そのｓｉＲＮＡ分子の発現を可能にする方式で含む発現ベクターを提供する。特定の実施形態では、発現ベクターは、ａ）転写開始領域、ｂ）転写終結領域、ならびにｃ）ｓｉＲＮＡ分子の少なくとも１本の鎖をコードしている核酸配列を含み、その配列は、ｓｉＲＮＡ分子の発現および／または送達を可能にする方式で開始領域および終結領域に作動可能なように連結している。

【００４７】

別の実施形態では、発現ベクターは、ａ）転写開始領域、ｂ）転写終結領域、ｃ）オープンリーディングフレーム、ならびにｄ）ｓｉＲＮＡ分子の少なくとも１本の鎖をコードしている核酸配列を含み、該配列は、オープンリーディングフレームの３’末端に作動可能なように連結しており、かつ、該配列は、ｓｉＲＮＡ分子の発現および／または送達を可能にする方式で、開始領域、オープンリーディングフレーム、および終結領域に作動可能なように連結している。

【００４８】

さらに別の実施形態では、発現ベクターは、ａ）転写開始領域、ｂ）転写終結領域、ｃ）イントロン、ならびにｄ）少なくとも１種のｓｉＲＮＡ分子をコードしている核酸配列を含み、該配列は、核酸分子の発現および／または送達を可能にする方式で、開始領域、イントロン、および終結領域に作動可能なように連結している。

【００４９】

別の実施形態では、発現ベクターは、ａ）転写開始領域、ｂ）転写終結領域、ｃ）イントロン、ｄ）オープンリーディングフレーム、ならびにｅ）ｓｉＲＮＡ分子の少なくとも１本の鎖をコードしている核酸配列を含み、該配列は、オープンリーディングフレームの３’末端に作動可能なように連結しており、かつ、該配列は、ｓｉＲＮＡ分子の発現および／または送達を可能にする方式で、開始領域、イントロン、オープンリーディングフレーム、および終結領域に作動可能なように連結している。

【００５０】

１実施形態では、ＳＰＡＲＣを阻害するｓｉＲＮＡに腫瘍細胞を接触させることによって、腫瘍細胞の増殖を抑制する。あるいは、腫瘍細胞が抵抗性を示す濃度の化学療法薬の存在下で、腫瘍細胞をｓｉＲＮＡと接触させてもよい。ＳＰＡＲＣの阻害因子であるｓｉＲＮＡ分子の例には、例えば、

ＡＡＴＣＣ　ＴＧＴ　ＣＣＡ　ＧＧＴ　ＧＧＡ　ＡＧＴ　Ａ（配列番号１）；
ＡＡＧＣＴ　ＣＣＡ　ＣＣＴ　ＧＧＡ　ＣＴＡ　ＣＡＴ　Ｃ（配列番号２）；および
ＡＡＴＧＡ　ＣＡＡ　ＧＴＡ　ＣＡＴ　ＣＧＣ　ＣＣＴ　Ｇ（配列番号３）

が挙げられる。

【００５１】

別の実施形態では、ＭｅｔＡＰ２／ｐ６７を阻害するｓｉＲＮＡに腫瘍細胞を接触させることによって、腫瘍細胞の増殖を抑制する。あるいは、腫瘍細胞が抵抗性を示す濃度の化学療法薬の存在下で、腫瘍細胞をｓｉＲＮＡと接触させてもよい。ＭｅｔＡＰ２／ｐ６７の阻害因子であるｓｉＲＮＡ分子の例には、例えば、

ＡＡＡＧＡ　ＴＣＡ　ＧＣＡ　ＴＴＧ　ＧＡＡ　ＧＡＴ　Ａ（配列番号４）；
ＡＡＧＣＡ　ＣＡＴ　ＣＧＡ　ＣＡＡ　ＧＴＴ　ＡＧＡ　Ａ（配列番号５）；および
ＡＡＡＣＡ　ＧＴＧ　ＣＣＧ　ＡＴＴ　ＧＴＧ　ＡＡＡ　Ｇ（配列番号６）

が挙げられる。

【００５２】

別の実施形態では、カルパイン２を阻害するｓｉＲＮＡに腫瘍細胞を接触させることによって、腫瘍細胞の増殖を抑制する。あるいは、腫瘍細胞が抵抗性を示す濃度の化学療法薬の存在下で、腫瘍細胞をｓｉＲＮＡと接触させてもよい。カルパイン２の阻害因子であるｓｉＲＮＡ分子の例には、例えば、

ＡＡＧＧＣ　ＡＴＡ　ＣＧＣ　ＣＡＡ　ＧＡＴ　ＣＡＡ　Ｃ（配列番号７）；
ＡＡＡＣＴ　ＴＣＴ　ＴＣＣ　ＴＧＡ　ＣＧＡ　ＡＴＣ　Ｇ（配列番号８）；および

ＡＡＡＣＧ　ＣＴＡ　ＴＴＣ　ＡＡＧ　ＡＴＡ　ＴＴＴ　Ａ（配列番号９）

が挙げられる。

【００５３】

別の実施形態では、Ｓ１００Ａ１０を阻害するｓｉＲＮＡに腫瘍細胞を接触させることによって、腫瘍細胞の増殖を抑制する。あるいは、腫瘍細胞が抵抗性を示す濃度の化学療法薬の存在下で、腫瘍細胞をｓｉＲＮＡと接触させてもよい。Ｓ１００Ａ１０の阻害因子であるｓｉＲＮＡ分子の例には、例えば、

ＡＡＡＴＧ　ＧＡＡ　ＣＡＣ　ＧＣＣ　ＡＴＧ　ＧＡＡ　Ａ（配列番号５９）；

ＡＡＡＴＴ　ＣＧＣ　ＴＧＧ　ＧＧＡ　ＴＡＡ　ＡＧＧ　Ｃ（配列番号６０）；および

ＡＡＴＡＡ　ＴＧＡ　ＡＧＧ　ＡＣＣ　ＴＧＧ　ＡＣＣ　Ａ（配列番号６１）

が挙げられる。

【００５４】

本発明は、腫瘍細胞の増殖を抑制、遅延、または防止するための方法であって、１または複数の化学療法剤と、表１に示す遺伝子である細胞遺伝子の少なくとも１種の阻害因子との組合せに、腫瘍細胞を接触させる工程からなる方法も提供する。好ましくは、腫瘍細胞は卵巣がん細胞である。化学療法剤は当技術分野で公知であり、例えば、シスプラチン、パクリタキセル、カルボプラチン、エトポシド、ヘキサメチルアミン、メルファラン、およびアントラサイクリン類が含まれる。

【００５５】

１実施形態では、表１に示す細胞遺伝子の阻害因子は、小分子の阻害因子でよい。本明細書では、「小分子」という用語は、分子量が約１５００ｇ／モル未満の分子を指す。小分子は、例えば、有機小分子、ペプチド、またはペプチド様分子でよい。例として、本発明の方法に適した小分子阻害因子は、ＰＤ１４７６３１、（２５，３５）－トランス－エポキシスクシニル－Ｌ－ロイシルアミド－３メチルブタンエチルエステル（Ｅ－６４－ｄ）、Ｎ－アセチル－ロイシル－ロイシル－ノルロイシナール（ＡＬＬＮ）、Ｎ－アセチル－Ｌｅｕ－Ｌｅｕ－Ｍｅｔ－アール（ＡＬＬＭまた$C_{19}H_{35}N_3O_4S$）、ＭＤＬ１８２７０などのカルパイン阻害因子；あるいは、ＴＮＰ－４７０（ＡＧＭ１４７０または$C_{19}H_{28}ClNO_6$としても知られている）、フマギリン（$C_{26}H_{34}O_7$）、シス－フマギリン（クォンら（Ｋｗｏｎ　ｅｔ　ａｌ．）、２０００年、Ｊ．Ａｎｔｉｂｉｏｔ．第５３巻、７９９～８０６ページを参照のこと）、フマガロン（ジョウら（Ｚｈｏｕ　ｅｔ　ａｌ．）、２００３年、Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．第４６巻、３４５２～３４５４ページを参照のこと）、オバリシン（$C_{16}H_{24}O_4$）などのＭｅｔＡＰ－２阻害因子でよい。ハンら（Ｈａｎ　ｅｔ　ａｌ．）、２０００年、Ｂｉｏｏｒｇａｎｉｃ＆Ｍｅｄｉｃｉｎａｌ　Ｃｈｅｍ．Ｌｅｔｔｅｒｓ　第１０巻、３９～４３ページも参照のこと。

【００５６】

１実施形態では、表１に示す細胞遺伝子の阻害因子は、上記に定義した阻害因子でよい。例えば、表１に示す特定の遺伝子に対する複数の阻害因子、１または複数の特定の遺伝子をそれぞれ阻害する阻害因子の組合せ、または表１に示す複数の遺伝子を阻害する阻害因子、あるいはそれらの任意の組合せなど、阻害因子の任意の組合せを使用することができる。

【００５７】

特定の実施形態では、本発明の方法は、ＭｅｔＡＰ２の阻害因子とプラチナ系の化学療法薬との組合せに腫瘍細胞を接触させる工程からなる。化学療法薬の主成分がシスプラチンまたはカルボプラチンであり、任意選択でタキソールまたはシクロホスファミドと組み合わされる場合、該化学療法薬は「プラチナ系」である。ＭｅｔＡＰ２の阻害因子は、例えば、フマギリンもしくはフマギリンの誘導体、または、それだけには限らないが配列番号４、配列番号５、配列番号６などのＭｅｔＡＰ２のｓｉＲＮＡでよい。

【００５８】
本発明は、卵巣がん患者の腫瘍が化学療法的治療に対して抵抗性であるかどうかを予測するための方法も提供する。これらの実施形態では、該方法は、（ａ）患者から得た生物試料中の、１または複数の表１に示されている発現遺伝子または該遺伝子によってコードされる遺伝子産物の量を検出する工程、（ｂ）対照試料中の、１または複数の表１に示されている発現遺伝子または該遺伝子によってコードされる遺伝子産物の量を検出する工程、（ｃ）工程（ａ）で測定された発現遺伝子または遺伝子産物の量を工程（ｂ）で検出された発現遺伝子または遺伝子産物の量と比較する工程からなり、工程（ａ）で検出された量が工程（ｂ）で検出された量と少なくとも２０％異なる場合は、その患者が化学療法に対して抵抗性であると予測される。１実施形態では、検出される量は、表１に示す遺伝子のｍＲＮＡの量でもよいし、表１に示す遺伝子によってコードされるタンパク質の量でもよい。別の実施形態では、対照試料は、反応性の被験者または正常な被験者、すなわち、治療法に反応する個体、または卵巣がんなどのがんに罹患していない個体から得た生物試料である。特定の態様では、生物試料は腫瘍試料である。

【００５９】
１実施形態では、工程（ａ）および工程（ｂ）で発現される遺伝子は、Ｓ１００Ａ１０、Ｓ１００Ａ１１、カルパイン２、ＳＰＡＲＣ、ＭｅｔＡＰ２、ＫＬＫ６、ＡＲＡ９、カルポニン２、ＲＮＰＳ１、ｅＩＦ５、ｅＩＦ２Ｂε、ＨＳＦ２、ＷＤＲ１、フューズドトウ（Ｆｕｓｅｄ　ｔｏｅｓ）、ＮＭ２３Ｄ、ＡＤＡＲ１、グランカルシン、ＮＢＲ１、ＳＡＰＫ／Ｅｒｋ１、亜鉛フィンガータンパク質－２６２ＭＹＭ、ＨＹＡ２２、ＭＲＰＬ４、ビネキシンβ、Ｇ－ＣＳＦＲ、ＩＧＦＢＰ－７、ＦＡＳＴキナーゼ、ＴＥＳＫ２、ＳＲＢ１、ＫＩＡＡ００８２のうちの１または複数であり、工程（ａ）で発現される遺伝子の量が工程（ｂ）で発現される遺伝子の量より少なくとも約２０％多い場合は、患者の腫瘍が化学療法的治療に対して抵抗性であると予測される。

【００６０】
特定の実施形態では、工程（ａ）および工程（ｂ）で発現される遺伝子は、ビネキシンβ、Ｇ－ＣＳＦＲ、ＫＬＫ６、ＳＰＡＲＣ、ＨＹＡ２２、カルパイン２、ＳＡＰＫ／Ｅｒｋ１、ＳＲＢ１、ＡＤＡＲ１、ＭＲＰＬ４、ｅＩＦ５、ｅＩＦ２Ｂε、ＷＤＲ１、ＮＭ２３Ｄ、亜鉛フィンガータンパク質－２６２ＭＹＭ、ＲＮＰＳ１、Ｓ１００Ａ１０、Ｓ１００Ａ１１、ＭｅｔＡＰ２のうちの１または複数であり、工程（ａ）で発現される遺伝子の量が工程（ｂ）で発現される遺伝子の量より少なくとも約２０％多い場合は、患者の腫瘍が化学療法的治療に対して抵抗性であると予測される。

【００６１】
別の実施形態では、工程（ａ）および工程（ｂ）で発現される遺伝子は、ＨＭＴ１、ＮＡＩＰ、ｅＥＦ１ε、ＲＡＢ２２Ａ、ＮＣＯＲ２、ＭＰＰ１０、ＭＴ１のうちの１または複数であり、工程（ａ）で発現される遺伝子の量が工程（ｂ）で発現される遺伝子の量より少なくとも約２０％、好ましくは５０％少ない場合は、患者の腫瘍が化学療法的治療に対して抵抗性であると予測される。

【００６２】
特定の実施形態では、工程（ａ）および工程（ｂ）で発現される遺伝子は、ＨＭＴ１、ｅＥＦ１ε、ＮＡＩＰ、ＲＡＢ２２Ａ、ＭＴ１のうちの１または複数であり、工程（ａ）で発現される遺伝子の量が工程（ｂ）で発現される遺伝子の量より少なくとも約２０％、好ましくは５０％少ない場合は、患者の腫瘍が化学療法的治療に対して抵抗性であると予測される。

【００６３】
したがって、本明細書で開示するように、本発明は、１または複数の遺伝子発現パターンまたは遺伝子産物活性のパターンを提供し、該パターンは、差次的に（すなわち、より多い量またはより少ない量で）発現される複数の遺伝子か、または、前記遺伝子によってコードされるタンパク質生成物が正常（すなわち、非腫瘍、または化学療法感受性の）細胞と比べて化学療法薬抵抗性の卵巣腫瘍細胞で差次的な活性を有する複数の遺伝子を含む

。差次的な遺伝子発現またはタンパク質生成物の活性の前記パターンは、生物試料、最も好ましくは腫瘍試料中の化学療法薬抵抗性の細胞を検出するために、本発明の方法に従って使用され、したがって、著しい罹患率および死亡率を伴う効果の無い治療過程を臨床医が開始する前に、個体から得た腫瘍の薬物抵抗性を予測するのに有用である。

【００６４】

本発明の方法の実施に際して、本明細書で特定する遺伝子のうちの１または複数の発現に関して患者の腫瘍試料を評価できることが、当業者には理解されよう。本明細書で特定する複数の遺伝子の各々は、個々の卵巣がん患者から単離した個々の腫瘍についてある比率で、最も好ましくは高い比率で、本明細書で開示する方法を用いて検出される差次的な遺伝子発現を示すことが予想される。本発明の予測方法を用いて得られる結果の信頼性は、本明細書で開示する差次的な遺伝子発現を示す前記遺伝子の分析される遺伝子数の増加とともに高まることも予想される。

【００６５】

１実施形態では、本発明の方法は、実際に患者を化学療法剤で治療する前に、化学療法を用いた治療が必要なヒト患者をスクリーニングするために使用することができる。したがって、本発明の方法は、特定の化学療法剤を用いて患者を治療することが無効か否かを医療提供者が判断するのを可能にするために、患者をスクリーニングするのに使用することができる。本発明の方法に基づいて化学療法に対して抵抗性ではないと予測される患者は、化学療法および／または表１に示す遺伝子の阻害因子を用いた治療の候補者である。本発明の方法に基づいて化学療法に対して抵抗性であると予測される患者は、特に外科治療、および／または表１に示す遺伝子の阻害因子を併用する化学療法的治療、あるいは別の治療方法の候補者とすることができる。

【００６６】

本発明の方法の実施に際して、本明細書で詳細に記述するように、例えば、ノーザンブロットやドットブロットなどのハイブリダイゼージョンアッセイにより、またはポリメラーゼ連鎖反応法（ＰＣＲ）などの増幅方法、より好ましくはｍＲＮＡのｃＤＮＡへの逆転写を加え（ＲＴ－ＰＣＲ）、さらに好ましくは定量的リアルタイムＲＴ－ＰＣＲとして当技術分野で公知の技術を用いて、生物試料中で発現されている、本明細書で特定する遺伝子のうちの任意のものをコードするｍＲＮＡの量を検出することによって、遺伝子発現を検出する。他の手法には前記１または複数の遺伝子のタンパク質生成物の量を検出することが挙げられるが、非限定的な例として、タンパク質に特異的な抗血清、より好ましくは抗体、さらに好ましくは、本明細書で特定する任意の特定の遺伝子に対して特異的なモノクローナル抗体を用いて生物試料を分析することによって検出される。タンパク質生成物の酵素活性または抗原活性に関して生物試料を分析することによって、タンパク質発現レベルを測定することもできる。本発明はまた、化学療法薬に抵抗性の腫瘍、特に卵巣腫瘍および結腸腫瘍において過剰発現または過小発現される遺伝子の発現を検出するための遺伝子アレイまたは抗体アレイも提供し、該アレイは、アレイ中の核酸プローブもしくは抗体の配置が、腫瘍試料が化学療法薬に抵抗性であるときに認識可能な、好ましくは機械可読なパターンを生じ、かつ／または腫瘍試料が化学療法薬に感受性のときに認識可能な異なるパターンを生じる。

【００６７】

例えば、本発明の方法によれば、患者から得た生物試料で発現されるＭｅｔＡＰ２の量を測定し、卵巣がんに罹患しており化学療法に反応した人、または卵巣がんに罹患しており化学療法に反応しなかった人のいずれかで発現されるＭｅｔＡＰ２の量と比較する。本明細書では、化学療法的治療が腫瘍のサイズを縮小し、または腫瘍の増殖を止める効果を示した場合、その人が化学療法に「反応」したとする。さらに、「反応性の患者」という用語は、外科的切除後に化学療法で治療され、少なくとも６ヶ月、疾患の臨床徴候が無いままである患者を意味するものとする。患者のＭｅｔＡＰ２の量が、卵巣がんに罹患し化学療法に反応した人で発現されるＭｅｔＡＰ２の量と等しいかまたはそれより少ない場合、その患者は、ある種の化学療法剤（例えば、プラチナ系化合物）に反応性であると予測

される。患者のＭｅｔＡＰ２の量が、卵巣がんに罹患し化学療法に反応した人で発現されるＭｅｔＡＰ２の量より多い場合、その患者は、化学療法剤に対して抵抗性であると予測される。同様に、患者のＭｅｔＡＰ２の量が、がんに罹患しているが化学療法に反応しなかった人で発現されるＭｅｔＡＰ２の量より多い場合も、その患者は、化学療法剤に対して抵抗性であると予測される。

【００６８】

表１および下記の実施例で示すように、卵巣がんでのＭｅｔＡＰ２発現の増大は、プラチナ系の化学療法剤であるシスプラチンに対する抵抗性の増大に関連がある。したがって、１実施形態では、本発明の方法は、がん患者から得た生物試料で発現されるＭｅｔＡＰ２の測定量が、反応性の個体で検出された所定の量より多い場合に、患者の腫瘍がプラチナ系の化学療法に対して抵抗性であると予測することができる。別の実施形態では、本発明の方法は、がん患者から得た生物試料で発現されるＭｅｔＡＰ２の測定量が、反応性の個体で検出された所定の量と同等であるが、Ｓ１００Ａ１０、Ｓ１００Ａ１１、カルパイン２、ＳＰＡＲＣ、ＫＬＫ６、ＡＲＡ９、カルポニン２、ＲＮＰＳ１、ｅＩＦ５、ｅＩＦ２Ｂε、ＨＳＦ２、ＷＤＲ１、フューズドトウ（Ｆｕｓｅｄ　ｔｏｅｓ）、ＮＭ２３Ｄ、ＡＤＡＲ１、グランカルシン、ＮＢＲ１、ＳＡＰＫ／Ｅｒｋ１、亜鉛フィンガータンパク質－２６２ＭＹＭ、ＨＹＡ２２、ＭＲＰＬ４、ビネキシンβ、Ｇ－ＣＳＦＲ、ＩＧＦＢＰ－７、ＦＡＳＴキナーゼ、ＴＥＳＫ２、ＳＲＢ１、もしくはＫＩＡＡ００８２のうち１または複数の遺伝子の発現が、反応性の患者よりも過剰に発現しているか、かつ／またはＨＭＴ１、ＮＡＩＰ、ｅＥＦ１ε、ＲＡＢ２２Ａ、ＮＣＯＲ２、ＭＴ１、ＭＰＰ１０遺伝子のうちの１または複数の発現が反応性の患者での発現と比べて低下している場合に、患者の腫瘍がプラチナ系の化学療法に対して抵抗性であると予測することができる。

【００６９】

本発明はさらに、卵巣がん患者、特に化学療法的治療を受けている卵巣がん患者における疾患の進行を観察するための方法を提供し、該方法は、（ａ）患者から採取した生物試料中の１または複数の発現遺伝子または該遺伝子によってコードされる遺伝子産物の量を検出する工程であって、その発現遺伝子が、Ｓ１００Ａ１０、Ｓ１００Ａ１１、カルパイン２、ＳＰＡＲＣ、ＭｅｔＡＰ２、ＫＬＫ６、ＡＲＡ９、カルポニン２、ＲＮＰＳ１、ｅＩＦ５、ｅＩＦ２Ｂε、ＨＳＦ２、ＷＤＲ１、フューズドトウ（Ｆｕｓｅｄ　ｔｏｅｓ）、ＮＭ２３Ｄ、ＡＤＡＲ１、グランカルシン、ＮＢＲ１、ＳＡＰＫ／Ｅｒｋ１、亜鉛フィンガータンパク質－２６２ＭＹＭ、ＨＹＡ２２、ＭＲＰＬ４、ビネキシンβ、Ｇ－ＣＳＦＲ、ＩＧＦＢＰ－７、ＦＡＳＴキナーゼ、ＴＥＳＫ２、ＳＲＢ１、ＫＩＡＡ００８２、ＭＰＰ１０、ＨＭＴ１、ＮＡＩＰ、ｅＥＦ１ε、ＲＡＢ２２Ａ、ＮＣＯＲ２、またはＭＴ１である工程、（ｂ）その後の採取により患者から得た生物試料を用いて工程（ａ）を繰り返す工程、ならびに（ｃ）工程（ａ）で検出される発現遺伝子または遺伝子産物の量を工程（ｂ）で検出される発現遺伝子または遺伝子産物の量と比較する工程からなり、工程（ａ）で採取した生物試料に対する、その後採取した生物試料中の発現遺伝子または遺伝子産物の量の差異を検出することによって、疾患の進行を観察する方法である。特定の態様では、生物試料は腫瘍試料である。

【００７０】

本明細書で説明するように、工程（ａ）および（ｂ）で発現される１または複数の遺伝子がＳ１００Ａ１０、Ｓ１００Ａ１１、カルパイン２、ＳＰＡＲＣ、ＭｅｔＡＰ２、ＫＬＫ６、ＡＲＡ９、カルポニン２、ＲＮＰＳ１、ｅＩＦ５、ｅＩＦ２Ｂε、ＨＳＦ２、ＷＤＲ１、フューズドトウ（Ｆｕｓｅｄ　ｔｏｅｓ）、ＮＭ２３Ｄ、ＡＤＡＲ１、グランカルシン、ＮＢＲ１、ＳＡＰＫ／Ｅｒｋ１、亜鉛フィンガータンパク質－２６２ＭＹＭ、ＨＹＡ２２、ＭＲＰＬ４、ビネキシンβ、Ｇ－ＣＳＦＲ、ＩＧＦＢＰ－７、ＦＡＳＴキナーゼ、ＴＥＳＫ２、ＳＲＢ１またはＫＩＡＡ００８２であり、工程（ｂ）で検出される発現遺伝子または遺伝子産物の量が、工程（ａ）での発現遺伝子または遺伝子産物の量と比べて多いとき、疾患の進行が検出される。いくつかの実施形態では、患者は、工程（ａ）での遺伝子発現量と工程（ｂ）での検出量との検出の間の期間、化学療法的治療または他の治

療を受ける。

【００７１】

本明細書で説明するように、工程（ａ）および（ｂ）で発現される１または複数の遺伝子がＨＭＴ１、ＮＡＩＰ、ｅＥＦ１ε、ＲＡＢ２２Ａ、ＮＣＯＲ２、ＭＴ１またはＭＰＰ１０であり、工程（ｂ）で検出される発現遺伝子または遺伝子産物の量が、工程（ａ）での発現遺伝子または遺伝子産物の量より少ないとき、疾患の進行が検出される。

【００７２】

いくつかの実施形態では、患者は、工程（ａ）での遺伝子発現量と工程（ｂ）での検出量との検出の間の期間、化学療法的治療または他の治療を受ける。いくつかの実施形態では、検出量は、表１に示す遺伝子のｍＲＮＡの量でもよいし、表１に示す遺伝子によってコードされるタンパク質の量でもよい。

【００７３】

患者の卵巣がんの進行を観察するための本発明の方法は、例えば、患者が、化学療法的治療計画などのある種の治療計画に対して陽性に反応しているか陰性に反応しているかを判定するのに使用することができる。

【００７４】

例えば、患者がある種の治療計画を開始した後のある時点で該患者から採取した生物試料において、Ｓ１００Ａ１０、Ｓ１００Ａ１１、カルパイン２、ＳＰＡＲＣ、ＭｅｔＡＰ２、ＫＬＫ６、ＡＲＡ９、カルポニン２、ＲＮＰＳ１、ｅＩＦ５、ｅＩＦ２Ｂε、ＨＳＦ２、ＷＤＲ１、フューズドトウ（Ｆｕｓｅｄ　ｔｏｅｓ）、ＮＭ２３Ｄ、ＡＤＡＲ１、グランカルシン、ＮＢＲ１、ＳＡＰＫ／Ｅｒｋ１、亜鉛フィンガータンパク質－２６２ＭＹＭ、ＨＹＡ２２、ＭＲＰＬ４、ビネキシンβ、Ｇ－ＣＳＦＲ、ＩＧＦＢＰ－７、ＦＡＳＴキナーゼ、ＴＥＳＫ２、ＳＲＢ１、またはＫＩＡＡ００８２の発現が、その治療計画が開始される前または開始時点で採取した生物試料での発現遺伝子の量と比べて、同じかまたは多い場合、患者は陰性に反応している。別の例では、患者がある種の治療計画を開始した後のある時点で該患者から採取した生物試料において、ＨＭＴ１、ＮＡＩＰ、ｅＥＦ１ε、ＲＡＢ２２Ａ、ＮＣＯＲ２、ＭＴ１、またはＭＰＰ１０の発現が、その治療計画が開始される前または開始時点で採取した生物試料での発現遺伝子の量と比べて、同じかまたは少ない場合、患者は陰性に反応している。このような場合、医療提供者は、その治療計画が有効ではないと判断することができる。

【００７５】

あるいは、患者がある種の治療計画を開始した後のある時点で該患者から採取した生物試料におけるＳ１００Ａ１０、Ｓ１００Ａ１１、カルパイン２、ＳＰＡＲＣ、ＭｅｔＡＰ２、ＫＬＫ６、ＡＲＡ９、カルポニン２、ＲＮＰＳ１、ｅＩＦ５、ｅＩＦ２Ｂε、ＨＳＦ２、ＷＤＲ１、フューズドトウ（Ｆｕｓｅｄ　ｔｏｅｓ）、ＮＭ２３Ｄ、ＡＤＡＲ１、グランカルシン、ＮＢＲ１、ＳＡＰＫ／Ｅｒｋ１、亜鉛フィンガータンパク質－２６２ＭＹＭ、ＨＹＡ２２、ＭＲＰＬ４、ビネキシンβ、Ｇ－ＣＳＦＲ、ＩＧＦＢＰ－７、ＦＡＳＴキナーゼ、ＴＥＳＫ２、ＳＲＢ１、またはＫＩＡＡ００８２の発現が、その治療計画が開始される前または開始時点で採取した生物試料での発現遺伝子の量と比べて少ない場合、患者は陽性に反応しており、治療の変更は必要とされない。さらに、患者がある種の治療計画を開始した後のある時点で該患者から採取した生物試料におけるＨＭＴ１、ＮＡＩＰ、ｅＥＦ１ε、ＲＡＢ２２Ａ、ＮＣＯＲ２、ＭＴ１、またはＭＰＰ１０の発現が、その治療計画が開始される前または開始時点で採取した生物試料での発現遺伝子の量と比べて多い場合、患者は陽性に反応している。

【００７６】

さらに、本発明は、患者のがんを治療するための薬剤としての薬剤組成物の有効性を観察するための方法を提供し、該方法は、（ａ）患者から採取した生物試料中の１または複数の発現遺伝子または該遺伝子によってコードされる遺伝子産物の量を検出する工程であって、その発現遺伝子が、Ｓ１００Ａ１０、Ｓ１００Ａ１１、カルパイン２、ＳＰＡＲＣ、ＭｅｔＡＰ２、ＫＬＫ６、ＡＲＡ９、カルポニン２、ＲＮＰＳ１、ｅＩＦ５、ｅＩＦ２

Ｂε、ＨＳＦ２、ＷＤＲ１、フューズドトウ（Ｆｕｓｅｄ　ｔｏｅｓ）、ＮＭ２３Ｄ、ＡＤＡＲ１、グランカルシン、ＮＢＲ１、ＳＡＰＫ／Ｅｒｋ１、亜鉛フィンガータンパク質－２６２ＭＹＭ、ＨＹＡ２２、ＭＲＰＬ４、ビネキシンβ、Ｇ－ＣＳＦＲ、ＩＧＦＢＰ－７、ＦＡＳＴキナーゼ、ＴＥＳＫ２、ＳＲＢ１、またはＫＩＡＡ００８２である工程、（ｂ）ある量の薬剤組成物を患者に投与する工程、（ｃ）その後の採取により患者から得た生物試料を用いて工程（ａ）を繰り返す工程、ならびに（ｄ）工程（ａ）で検出される発現遺伝子または遺伝子産物の量を工程（ｃ）で検出される発現遺伝子または遺伝子産物の量と比較する工程からなり、工程（ａ）で採取した生物試料に対する、その後採取した生物試料中の発現遺伝子または遺伝子産物の量の変化を検出することによって薬剤組成物の有効性を観察する方法である。薬剤組成物を用いた治療後に採取した生物試料での遺伝子発現が、薬剤組成物を用いた治療の前に採取した生物試料での遺伝子発現より多いかまたは等しく、かつ、薬剤組成物を用いた治療の間、腫瘍の成長が減速、遅延、および抑制されなかった場合、その薬剤組成物はその患者のがんの治療には無効であるとみなすことができる。例えば、Ｓ１００Ａ１０のｍＲＮＡの量が、患者を薬剤組成物で治療した後に得た試料においてより多い場合は、その患者はその薬剤組成物を用いたさらなる治療に対して抵抗性であると予測される。したがって、その薬剤組成物は、その患者のがんに対して無効であるとみなされる。特定の態様では、生物試料は腫瘍試料である。

【００７７】

本発明は、患者のがんを治療するための薬剤としての薬剤組成物の有効性を観察するための方法をさらに提供し、該方法は、（ａ）患者から採取した生物試料中の１または複数の発現遺伝子または該遺伝子によってコードされる遺伝子産物の量を検出する工程であって、その発現遺伝子が、ＨＭＴ１、ＮＡＩＰ、ｅＥＦ１ε、ＲＡＢ２２Ａ、ＮＣＯＲ２、ＭＴ１、またはＭＰＰ１０である工程、（ｂ）ある量の薬剤組成物を患者に投与する工程、（ｃ）その後の採取により患者から得た生物試料を用いて工程（ａ）を繰り返す工程、ならびに（ｄ）工程（ａ）で検出された発現遺伝子または遺伝子産物の量を工程（ｃ）で検出された発現遺伝子または遺伝子産物の量と比較する工程からなり、工程（ａ）で採取した、すなわち、薬剤組成物を用いて治療する前に採取した生物試料に対する、薬剤組成物を用いて治療した後に採取した生物試料中の発現遺伝子または遺伝子産物の量の変化を検出することによって薬剤組成物の有効性を観察する方法である。後で採取した（すなわち、薬剤組成物を用いた治療の後に採取した）生物試料での１または複数の前記遺伝子の遺伝子発現が、先に採取した生物試料（すなわち、薬剤組成物を用いる治療の前に採取した生物試料）での遺伝子発現より低いかまたはそれに等しく、かつ、薬剤組成物を用いた治療の間、腫瘍の成長が減速、遅延、および抑制されなかった場合、その薬剤組成物はその患者のがんの治療には無効であるとみなすことができ、その患者は、その薬剤組成物を用いたさらなる治療に対して抵抗性であると予測される。したがって、その薬剤組成物は、その患者のがんに対して無効であるとみなされる。特定の態様では、生物試料は腫瘍試料である。

【００７８】

本明細書では、「薬剤組成物」とは、結腸がんや卵巣がんなどのがんを治療するために使用される、または前記がんを治療する能力について試験される化合物（例えば、タンパク質、ペプチド、ペプチドミメティック、非ペプチド性有機分子、無機低分子、または核酸分子）を含む任意の配合物でよい。

【００７９】

本発明は、腫瘍細胞、特に化学療法抵抗性の腫瘍細胞、最も具体的には化学療法抵抗性の卵巣がん細胞の増殖を抑制する化合物を同定するための方法も提供する。これらの実施形態では、この方法は、（ａ）化学療法抵抗性の卵巣がん細胞において過剰発現される１または複数の遺伝子を発現する細胞を試験化合物と接触させる工程であって、その遺伝子が、Ｓ１００Ａ１０、Ｓ１００Ａ１１、カルパイン２、ＳＰＡＲＣ、ＭｅｔＡＰ２、ＫＬＫ６、ＡＲＡ９、カルポニン２、ＲＮＰＳ１、ｅＩＦ５、ｅＩＦ２Ｂε、ＨＳＦ２、ＷＤＲ１、フューズドトウ（Ｆｕｓｅｄ　ｔｏｅｓ）、ＮＭ２３Ｄ、ＡＤＡＲ１、グランカル

シン、ＮＢＲ１、ＳＡＰＫ／Ｅｒｋ１、亜鉛フィンガータンパク質－２６２ＭＹＭ、ＨＹＡ２２、ＭＲＰＬ４、ビネキシンβ、Ｇ－ＣＳＦＲ、ＩＧＦＢＰ－７、ＦＡＳＴキナーゼ、ＴＥＳＫ２、ＳＲＢ１、またはＫＩＡＡ００８２である工程、（ｂ）試験化合物の存在下および不在下での遺伝子の発現を検出する工程、ならびに（ｃ）試験化合物の存在下での遺伝子発現を試験化合物の不在下での遺伝子発現と比較する工程からなり、試験化合物の存在下での遺伝子の発現が試験化合物の不存下での遺伝子発現と比べて低減されている場合、化合物は化学療法抵抗性の腫瘍細胞の増殖を抑制する化合物として同定される。特定の態様では、生物試料は腫瘍試料である。いくつかの実施形態では、この化合物は、化学療法薬の存在下で腫瘍細胞の増殖を抑制することができる。

【００８０】

さらに、本発明は、腫瘍細胞、特に化学療法抵抗性の腫瘍細胞、最も具体的には化学療法抵抗性の卵巣がん細胞の増殖を抑制する化合物を同定する方法を提供し、該方法は、（ａ）化学療法抵抗性の卵巣がん細胞において通常より低いレベルで発現される１または複数の遺伝子を発現する細胞を試験化合物に接触させる工程であって、その遺伝子が、ＨＭＴ１、ＮＡＩＰ、ｅＥＦ１ε、ＲＡＢ２２Ａ、ＮＣＯＲ２、ＭＴ１、またはＭＰＰ１０である工程、（ｂ）その試験化合物の存在下および不在下でのその遺伝子の発現を検出する工程、ならびに（ｃ）その試験化合物の存在下および不在下でのその遺伝子の発現を比較する工程からなり、試験化合物の存在下での遺伝子の発現が試験化合物の不存下での遺伝子発現と比べて増大している場合、化合物は化学療法抵抗性の腫瘍細胞の増殖を抑制する化合物として同定される。１実施形態では、この化合物は、化学療法薬の存在下で腫瘍細胞の増殖を抑制することができる。

【００８１】

実施された実験および得られた結果を含めて、以下の実施例は単に例示のために提供されるにすぎず、本発明を限定するものとして解釈すべきではない。

【実施例１】

【００８２】

ＭＴＴ細胞増殖アッセイ

標準のＭＴＴ細胞増殖アッセイを用いて、５種の卵巣がん細胞株（ＯＶＣＡ４２９、ＯＶＣＡ４３３、ＯＶＣＡ４３２、ＨＥＹ、およびＨＥＹ　Ａ８）を、シスプラチンへの感受性のレベルに従って順位付けした。

【００８３】

イーグルの最少培地（ＭＥＭα、インビトロジェンコーポレーション社（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　Ｃｏｒｐ．）［米国カリフォルニア州カールズバッド（Ｃａｒｌｓｂａｄ）所在］から入手）、５％ウシ胎児血清（ＦＢＳ、加熱して不活性化）、１％抗生物質／抗真菌剤混合物（インビトロジェン社（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ））中で細胞を増殖させた。ＭＴＴ原液（５ｍｇ／ｍＬ；カルビオケム社（ＣＡＬＢＩＯＣＨＥＭ）［米国カリフォルニア州サンディエゴ（Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ）所在］）を、ＨＢＳＳ（ハンクス平衡塩類溶液）中に色素を溶解させて調製し、前記混合物をろ過し、１ｍｌの分注物として－２０℃で保存した。各９ｍｌの培地に対して１ｍｌのＭＴＴ原液を使用した（総体積は１０ｍｌである）。細胞を光から保護するために、プレートを不透明なカバーで覆った。

【００８４】

５、２５、５０、１００、および２００μＭのシスプラチンで、４、８、および２４時間、各細胞株を処理した。９６ウェルプレートでのシスプラチン処理の９６時間後にＭＴＴアッセイを実施した。細胞から培地を除去し、新鮮なＭＴＴ培地２００μｌを細胞に添加し、また、対照となる空のウェルにも添加した。通常の細胞培養条件のもとで、３～４時間、細胞をインキュベートした。次に、細胞が代謝活性の指標であるホルマザン結晶を形成しているかどうか確認した。培地を除去し、２－プロパノール２００μｌをウェルおよび対照ウェルに添加した。全ての結晶を均等に溶解した後、暗所、室温で２０分間、細胞をインキュベートした。マイクロプレートリーダーで５７０ｎｍにて結果を読み取った。

【００８５】
図３９（上側パネル）は、様々な濃度のシスプラチンに曝露した４時間後の、これらの検討で使用した５種類の卵巣がん細胞株についてのＭＴＴアッセイの結果を示す。使用したシスプラチン濃度および処理時間の全範囲にわたって各細胞株の成績を考慮した後に、抵抗性のレベルの高いほうから低いほうへ、細胞をＯＶＣＡ４２９＜ＯＶＣＡ４３３＜ＨＥＹ　Ａ８＜ＯＶＣＡ４３２＜ＨＥＹの順番に順位付けした（下側パネル）。
【００８６】
前述とほぼ同じようにして、特定の遺伝子に対するｓｉＲＮＡまたは薬物阻害因子に細胞を曝露することを含むＭＴＴアッセイを実施した。細胞をｓｉＲＮＡで４８時間前処理してから、０、３．１２、６．２５、１２．５、２５、５０、１００、および２００μＭのシスプラチンで２４時間処理した。薬物併用治療の実験（フマギリンまたはＡＬＬＮ）については、濃度を段階的に上げた試験対照の薬物と０、３．１２、６．２５、１２．５、２５、５０、１００、および２００μＭのシスプラチンとの併用治療に細胞を２４時間曝露させた。
【実施例２】
【００８７】
ｃＤＮＡマイクロアレイ、ノーザンブロット、および定量的リアルタイムＰＣＲ解析
実施例１で特徴付けした細胞株を用いてマイクロアレイ解析を実施した。各細胞株から細胞ペレットを集め、１ｍｌのＴＲＩ試薬（モレキュラーリサーチセンターインコーポレイテッド社（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｃｅｎｔｅｒ，Ｉｎｃ）［米国オハイオ州シンシナティ（Ｃｉｎｃｉｎｎａｔｉ）所在］から入手）またはＴｒｉｚｏｌ（登録商標）（インビトロジェン（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）社）中にペレットを溶解させることによって、細胞からＲＮＡを単離した。次に、試料を５分間放置した。１－ブロモ－３－クロロプロパン（ＢＣＰ）１００μｌを試料に添加して、相分離を行った。１５秒間振とうした後、室温で１５分間、試料をインキュベートし、続いて、１３，０００ＲＣＦ、４～２５℃で１６分間遠心分離した。ピペットで上清を取り出し、新しい微小遠心チューブ中に入れた。次に、上清を５００μｌの新しいイソプロパノールと混合することによってＲＮＡを沈殿させ、室温で１０分間インキュベートし、１３，０００ＲＣＦ、４～２５℃で９分間遠心分離した。次に、上清をチューブから除去し、該チューブに１ｍｌの７５％エタノールを加え、ボルテックス（渦流混合）処理し、次いで１３，０００ＲＣＦにて４～２５℃で６分間遠心分離することによって、ペレットを洗浄した。液体を除去し、ペレットを約８分間、風乾させた。次に、ペレットをＲＮａｓｅフリーの水に溶解し、すぐに使用する場合は氷中に置き、または－８０℃で保存した。
【００８８】
５０００を超える配列確認済みのｃＤＮＡクローンを含むマイクロアレイ（リサーチジェネティックスインコーポレイティッド社（Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ　Ｉｎｃ．）から入手）を用いて、これらの細胞における遺伝子発現を調べた；マイクロアレイ解析は全て、製造業者の取扱説明書に従って実施した。各クローンは卵巣組織で発現することが周知のものである。最も抵抗性の高い細胞株（ＯＶＣＡ４２９）での遺伝子発現を、他の細胞株での遺伝子発現を比較する際の標準として用いた。データの解析から、ＯＶＣＡ４２９は、より感受性の高い細胞株と比較して、１９６種の遺伝子をより高いレベルで発現し、８３種の遺伝子をより低いレベルで発現していることが明らかになった。
【００８９】
遺伝子を、以下の基準を満たす場合にのみさらに解析するために選別した；基準とはすなわち、２連の（ｄｕｐｌｉｃａｔｅ）メンブレンで検出した際に標準と比べて発現に少なくとも２倍の差があること、標準（ＯＶＣＡ４２９）と比較して、４種の細胞株のうち３種で差次的な発現が検出されること、および発現レベルが各細胞株のシスプラチン感受性と一致していることである。過剰発現された遺伝子は、ＯＶＣＡ４２９細胞で最も強く発現され、最も抵抗性の低い細胞株ＨＥＹにおいて最低レベルの発現に到達するまで発現は次第に弱くなった（また、ＯＶＣＡ４２９細胞で低いレベルで発現された遺伝子につい

ては逆であった）。

【００９０】

他の細胞株と比較した際、最も抵抗性の高い細胞株（ＯＶＣＡ４２９）において差次的に（より高いレベルまたはより低いレベルで）発現された遺伝子のノーザンブロット解析および定量的リアルタイムＰＣＲ解析を用いて、マイクロアレイデータを検証し、さらに解析するための目的遺伝子を特定した。特定した遺伝子を表２に示す。表２は、遺伝子の名称、細胞株における発現パターンの概要、および発現解析の結果を表す図面を示す。

【００９１】

【表２】

表2

GenBank 登録番号	GeneCard cDNA id #	名称	細胞株で検証された発現パターン	図
BC015973	756595	S100A10 p11 CLP11 カルパクチン1 軽鎖 42C	シスプラチン抵抗性の増大とともに上昇	1
BC001410	810612	S100A11 S100C カルギザリン	シスプラチン抵抗性の増大とともに上昇	2
AF261089	549728	カルパイン2 CANPL2 mCANP	シスプラチン抵抗性の増大とともに上昇	6
BC004974	250654	SPARC オステオネクチン BM-40	シスプラチン抵抗性の増大とともに上昇	4
BC013782	39093	MetAP2 p67eIF2 MNPEP	シスプラチン抵抗性の増大とともに上昇	8

GenBank 登録番号	GeneCard cDNA id #	名称	細胞株で検証された発現パターン	図
BC015525	809784	KLK6 ザイム ニューロシン プロテアーゼM	シスプラチン抵抗性の増大とともに上昇	17
AF222689	246120	HMT1 HMT2 ANM1 HCP1	シスプラチン抵抗性の増大とともに低下	18
U31913	814731	ARA9 XAP2	シスプラチン抵抗性の増大とともに上昇	19
D83735	713886	カルポニン2	シスプラチン抵抗性の増大とともに上昇	20
U19251	1046522	NAIP	シスプラチン抵抗性の増大とともに低下	21
BC005291	306921	eEF1ε P18	シスプラチン抵抗性の増大とともに低下	13
AF015608	897594	RNPS1	シスプラチン抵抗性の増大とともに上昇	22
U49436	884867	eIF5 Eif5A	シスプラチン抵抗性の増大とともに上昇	10
BC013590	1630998	Eif2Bε	シスプラチン抵抗性の増大とともに上昇	12

GenBank 登録番号	GeneCard cDNA id #	名称	細胞株で検証された発現パターン	図
M65217	669443	HSF2 HSTF2	シスプラチン抵抗性の増大とともに上昇	23
AB010427	714196	WDR1 NORI-1	シスプラチン抵抗性の増大とともに上昇	24
BC001134	321247	フューズドトウ (Ft1)	シスプラチン抵抗性の増大とともに上昇	25
BC004880	203003	NM23D nm23-H4	シスプラチン抵抗性の増大とともに上昇	26
U10439	950367	ADAR1	シスプラチン抵抗性の増大とともに上昇	27
BC005214	34140	グランカルシン	シスプラチン抵抗性の増大とともに上昇	7
BC009808	882511; M17S2	NBR1	シスプラチン抵抗性の増大とともに上昇	28
L36870	726147	SAPK/Erk 1 JNKK1 MEK4 MKK4 MAPKK4	シスプラチン抵抗性の増大とともに上昇	14

GenBank 登録番号	GeneCard cDNA id #	名称	細胞株で検証された発現パターン	図
AB007885	427980	亜鉛フィンガータンパク質－262 MYM	シスプラチン抵抗性の増大とともに上昇	29
D88153	123980	HYA22	シスプラチン抵抗性の増大とともに上昇	**31**
AB049635	824568	MRPL4 CGI-28	シスプラチン抵抗性の増大とともに上昇	**30**
AF037261	1636620	ビネキシンβ	シスプラチン抵抗性の増大とともに上昇	**32**
M59818	809639	G-CSFR	シスプラチン抵抗性の増大とともに上昇	33
BC015710	838636	RAB22A	シスプラチン抵抗性の増大とともに低下	36
BC017201	68605	IGFBP-7 MAC25 FSTL2	シスプラチン抵抗性の増大とともに上昇	35
BC011770	345077	FASTキナーゼ	シスプラチン抵抗性の増大とともに上昇	16

GenBank 登録番号	GeneCard cDNA id #	名称	細胞株で検証された発現パターン	図
AB057597	845441	TESK2	シスプラチン抵抗性の増大とともに上昇	15
BC022087	756687	SRB1 CLA1 CD36L1	シスプラチン抵抗性の増大とともに上昇	**34**
BC031890	825293	KIAA0082	シスプラチン抵抗性の増大とともに上昇	37
NM_006312	743230; NCOR2	NCOR2	シスプラチン抵抗性の増大とともに低下	38
BC032338	297392	MT1	シスプラチン抵抗性の増大とともに低下	51
X98494	825214	MPP10	シスプラチン抵抗性の増大とともに低下	52

*GeneCardはイスラエル国レホボト所在のワイズマン研究所(Weizmann Institute of Science)の登録商標であり、割り当てられる数値は随時変更される可能性がある。

ノーザンブロット解析

マイクロアレイ解析で特定した発現パターンを確認するために、ＮｏｒｔｈｅｒｎＭａｘ（登録商標）法（アンビオンコーポレーション社（Ａｍｂｉｏｎ　Ｃｏｒｐ．）［米国テキサス州オースティン（Ａｕｓｔｉｎ）所在］を用いてノーザンブロット解析を実施し、製造業者の取扱説明書に従ってＳｔｒｉｐ－ＥＺ（登録商標）ＤＮＡ標識キット（アンビオン社（Ａｍｂｉｏｎ））を用いてＤＮＡプローブを標識した。

【００９２】

定量的リアルタイムＰＣＲ

卵巣がん細胞株から単離した１μｇの細胞内全ＲＮＡ、１μｇのオリゴｄＴ、および水を一緒に混合して最終体積１２μｌとし、この混合物を７０℃で１０分間インキュベートし、次いで、５μｌの２×反応混合液（Ｒｅａｃｔｉｏｎ　Ｍｉｘ）、２μｌのＤＴＴ、および１μｌの酵素Ｓｕｐｅｒｓｃｒｉｐｔ（商標）ＩＩ（インビトロジェン社（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ））をこの混合物に加えることによって、ｃＤＮＡを合成した。次に、この反応混合物を４２℃で６０分間インキュベートした。１：４～１：２５６のｃＤＮＡ希釈液を調製した。「Ｑｉａｇｅｎ　ＱｕａｎｔｉＴｅｃｔ　ＳＹＢＲ　Ｇｒｅｅｎ　ＰＣ

Ｒ Ｈａｎｄｂｏｏｋ」（キアゲンコーポレーション社（Ｑｉａｇｅｎ Ｃｏｒｐ.）［米国カリフォルニア州バレンシア（Ｖａｌｅｎｃｉａ）所在］を用いて、最終体積５０μｌ／ウェルとなるようにマスターミックス（Ｍａｓｔｅｒ ｍｉｘ）を調製した。使用したプレートの各ウェルに対して、２５μｌの２×ＱｕａｎｔｉＴｅｃｔ（登録商標）ＳＹＢＲ Ｇｒｅｅｎ ＰＣＲ Ｍａｓｔｅｒ Ｍｉｘ（キアゲン社（Ｑｉａｇｅｎ））、０．３μＭの順行（フォワード）プライマー、０．３μＭの逆行（リバース）プライマー、およびＲＮａｓｅフリー水を加えて最終体積４５μｌとした。

【００９３】

各遺伝子用のマスターミックスを完全に混合し、適切な体積量を分取して、ＰＣＲチューブまたはプレート中に以下のように入れた。すなわち、鋳型無し（対照）＝遺伝子のマスターミックス４５μｌ＋H_2O ５μｌ；緩衝液ブランク＝H_2O ２５μｌ＋ＳＹＢＲミックス２５μｌ；試験試料＝遺伝子のマスターミックス４５μｌ＋ｃＤＮＡ（上記のように希釈したもの）５μｌとした。

【００９４】

ＡＢＩ Ｐｒｉｓｍ（登録商標）７７００（アプライドバイオシステムズインコーポレイテッド社（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ，Ｉｎｃ.）［米国カリフォルニア州フォスター市（Ｆｏｓｔｅｒ Ｃｉｔｙ）所在］配列検出システム、またはＭＪリサーチ（ＭＪ Ｒｅｓｅａｒｃｈ）社（［米国マサチューセッツ州ウォルサム（Ｗａｌｔｈａｍ）所在］）のＯｐｔｉｃｏｎ（登録商標）ＩＩシステムを用いて、以下のようにして配列検出を実施した：ＰＣＲの最初の活性化工程は、９５℃で１５分間実施した。試料を９４℃で１５秒間変性させ、５３℃（ＯｐｔｉｃｏｎＩＩシステムを使用するときは５５℃）で３０秒間アニーリングし、７２℃で３０秒間伸長させた（データはこの工程の間に取得した）。ＰＣＲ反応を５０サイクル繰り返した。以下の工程、すなわち９５℃で１５秒、６０℃で２０秒、９５℃で２０秒の工程を追加することによって、融解曲線解析の準備をした。

【００９５】

さらに、プラチナ系の化学療法剤を用いた治療を受けたことがある化学療法感受性（すなわち反応性）および化学療法抵抗性（すなわち非反応性）の卵巣がん患者から得た組織試料からＲＮＡを調製した。５０～１００ｍｇの組織試料を１ｍｌのＴＲＩ試薬またはＴｒｉｚｏｌ中で組織が液化されるまでホモジナイズすることによって、ＲＮＡを単離した。次に、試料を５分間放置した。ＢＣＰ １００μｌを試料に添加して、相分離を行った。１５秒間振とうした後、室温で１５分間、試料をインキュベートし、続いて、１３，０００×ｇ（相対遠心力、ＲＣＦ）、４～２５℃で９分間遠心分離した。ピペットで上清を取り出し、新しい微小遠心チューブ中に入れた。次に、上清を５００μｌの新しいイソプロパノールと混合することによってＲＮＡを沈殿させ、室温で２０分間インキュベートし、１３，０００ＲＣＦ、４～２５℃で９分間遠心分離した。次に、上清をチューブから除去し、該チューブに１ｍｌの７５％エタノールを加え、ボルテックス混合し、次いで１３，０００ＲＣＦ、４～２５℃で６分間遠心分離することによって、ペレットを洗浄した。液体を除去し、ペレットを約８分間、風乾させた。次に、ペレットをＲＮａｓｅフリーの水に溶解し、すぐに使用する場合は氷中に置き、または－８０℃で保存した。

【００９６】

化学療法感受性の患者と化学療法抵抗性の患者との間の遺伝子発現の変化を検出するために、表３に示す遺伝子に対するプライマーを用いた定量的リアルタイムＰＣＲを実施した。１８Ｓ ＲＮＡの発現を用いて発現遺伝子の値を補正した。結果を以下の表３に示す。これらの結果は、細胞株由来のＲＮＡを用いて行った実験から得られた観察結果を裏付けている。

【００９７】

【表３】

表3

遺伝子名	GenBank 登録番号	化学療法感受性の患者における発現(倍)	化学療法抵抗性の患者における発現(倍)	差(倍)
ビネキシンβ	AF037261	1.4	2.8	2.0
G-CSFR	M59818	1.7	2.6	1.5
KLK6	BC015525	0.3	3.3	11.0
SPARC	BC004974	3.6	6.0	1.7
HYA22	D88153	1.75	2.4	1.4
MRPL4	AB049635	0.3	0.8	2.7
eIF5	U49436	0.8	1.3	1.6
RAB22A	BC015710	0.15	0.075	2.0*
MT1	BC032338	0.9	0.6	1.5*
MYM	AB007885	0.6	1.5	2.5
RNPS1	AF015608	0.7	1.4	2.0
S100A11	BC001410	1.0	2.0	2.0
MetAP2	BC013782	0.175	0.21	1.2
S100A10	BC015973	0.15	0.25	1.7
SAPK	L36870	0.40	0.95	2.4
カルパイン2	AF261089	0.12	0.19	1.6
NM23D	BC004880	0.70	1.3	1.9
NIAP	U19251	4	2	2.0*
SRB1	BC022087	0.08	0.13	1.6
WDR1	AB010427	1.5	5	3.3
HMT1	AF222689	0.19	0.05	3.8*
eEF1,	BC005291	0.65	0.15	4.3*
eIF2B,	BC013590	0.40	0.75	1.9
ADAR1	U10439	0.65	0.8	1.2

* この差は化学療法抵抗性の患者における遺伝子発現の低下を反映している

リアルタイムＰＣＲによって遺伝子発現を検証するために、以下のプライマー配列を用いた。

【００９８】

２５０６５４（この遺伝子は、特異的な分子ビーコンプローブを用いて最初に検証したが、その後の検討はＳＹＢＲグリーンを用いて実施した）

分子ビーコンを用いた検証：

ビーコン：ＦＡＭ－ＣＧＣＧＴＡＴＧＡＡＣＴＧＧＧＣＴＴＡＴＧＴＧＡＣＧＣＧ－ＤＡＢＣＹＬ（配列番号１３）

隣接順行プライマー：ＣＴＧＧＧＣＴＣＴＧＣＣＴＴＡＡＡＣＡＣ（配列番号１４）
隣接逆行プライマー：ＧＣＴＣＣＣＡＡＡＡＧＴＴＴＧＡＡＣＣＡ（配列番号１５）
内部順行プライマー：ＴＴＧＣＣＴＧＡＧＧＣＴＧＴＡＡＣＴＧＡ（配列番号１６）
内部逆行プライマー：ＧＣＴＣＣＣＡＡＡＡＧＴＴＴＧＡＡＣＣＡ（配列番号６２）
ＳＹＢＲグリーンの場合：
順行：ＣＣＡ　ＣＴＴ　ＣＴＴ　ＴＧＣ　ＣＡＣ　ＡＡＡ　ＧＴ（配列番号１７）
逆行：ＧＡＡ　ＴＴＣ　ＧＧＴ　ＣＡＧ　ＣＴＣ　ＡＧＡ　ＧＴ（配列番号１８）
８１０６１２（この遺伝子は、特異的な分子ビーコンプローブを用いて検証した）
ビーコン：ＦＡＭ－ＣＧＣＣＴＧＧＧＴＧＧＧＴＴＴＧＡＡＧＧＡＧＧＣＧ－ＤＡＢＣＹＬ（配列番号１９）
隣接順行プライマー：ＡＴＣＧＡＧＴＣＣＣＴＧＡＴＴＧＣＴＧＴ（配列番号２０）
隣接逆行プライマー：ＧＣＣＴＧＣＡＴＧＡＧＧＴＧＧＴＴＡＧＴ（配列番号２１）
内部順行プライマー：ＣＴＴＧＣＣＡＴＧＡＣＴＣＣＴＴＣＣＴＣ（配列番号２２）
内部逆行プライマー：ＧＣＣＴＧＣＡＴＧＡＧＧＴＧＧＴＴＡＧＴ（配列番号６３）
３９０９３
順行：ＧＣＡ　ＧＡＡ　ＧＣＡ　ＣＡＴ　ＣＧＡ　ＣＡＡ　ＧＴ（配列番号２３）
逆行：ＧＣＣ　ＴＧＣ　ＡＴＴ　ＴＡＡ　ＴＣＣ　ＡＴＴ　ＣＴＣ（配列番号２４）
８８２５１１
順行：ＴＡＡ　ＣＣＡ　ＣＧＴ　ＣＣＴ　ＧＣＴ　ＧＡＡ　ＧＴ（配列番号２５）
逆行：ＧＣＴ　ＴＴＡ　ＡＧＡ　ＡＡＧ　ＴＴＣ　ＴＴＡ　ＴＣＡ　ＡＣ（配列番号２６）
９５０３６７
順行：ＧＣＡ　ＣＡＧ　ＣＧＧ　ＡＧＴ　ＧＧＴ　ＡＡＧ　Ａ（配列番号２７）
逆行：ＣＡＧ　ＡＧＧ　ＡＧＴ　ＣＡＧ　ＡＣＡ　ＣＡＴ　ＴＧ（配列番号２８）
３４１４０
順行：ＧＴＡ　ＴＡＣ　ＴＴＡ　ＣＴＴ　ＣＡＧ　ＴＧＣ　ＴＧＴ　Ｔ（配列番号２９）
逆行：ＣＡＴ　ＴＣＴ　ＴＧＣ　ＴＡＴ　ＡＡＣ　ＧＴＴ　ＴＡＡ　ＣＡ（配列番号３０）
７２６１４７
順行：ＣＴＣ　ＴＧＴ　ＧＡＣ　ＴＴＣ　ＧＧＣ　ＡＴＣ　Ａ（配列番号３１）
逆行：ＣＡＧ　ＡＣＡ　ＴＣＡ　ＧＡＧ　ＣＧＧ　ＡＣＡ　Ｔ（配列番号３２）
４２７９８０
順行：ＡＡＧ　ＡＡＣ　ＴＧＧ　ＧＴＴ　ＣＡＧ　ＴＧＧ　ＡＡＡ（配列番号３３）
逆行：ＧＡＧ　ＡＧＴ　ＧＣＡ　ＴＧＧ　ＴＣＴ　ＴＧＡ　ＧＴ（配列番号３４）
１２３９８０
順行：ＡＧＣ　ＣＡＣ　ＣＡＧ　ＣＴＡ　ＡＧＴ　ＡＣＣ　ＴＴ（配列番号３５）
逆行：ＣＡＴ　ＣＧＡ　ＴＴＴ　ＣＡＡ　ＣＣＧ　ＧＡＡ　ＣＡＡ（配列番号３６）
８２４５６８
順行：ＧＴＧ　ＴＧＴ　ＧＧＡ　ＣＣＴ　ＣＣＡ　ＴＧＴ　ＴＡ（配列番号３７）
逆行：ＡＧＣ　ＡＣＡ　ＣＣＡ　ＴＴＡ　ＣＡＧ　ＡＣＡ　ＡＧＴ（配列番号３８）
１６３６６２０
順行：ＧＧＡ　ＡＣＣ　ＡＧＴ　ＴＴＣ　ＴＧＣ　ＡＧＧ　ＡＡ（配列番号３９）
逆行：ＣＴＣ　ＣＡＧ　ＣＡＧ　ＣＡＣ　ＣＴＣ　ＡＡＴ　Ｇ（配列番号４０）
８０９６３９
順行：ＡＴＣ　ＣＡＡ　ＧＧＴ　ＴＡＴ　ＧＴＧ　ＧＴＴ　ＴＣＴ　Ｔ（配列番号４１）
逆行：ＣＡＣ　ＣＴＣ　ＣＴＧ　ＧＧＣ　ＴＴＣ　ＴＧＡ　Ａ（配列番号４２）
７５６６８７
順行：ＧＡＴ　ＣＣＡ　ＴＧＡ　ＡＧＣ　ＴＡＡ　ＴＧＴ　ＡＣＡ　Ａ（配列番号４３）
逆行：ＡＣＧ　ＧＧＣ　ＡＧＡ　ＡＧＣ　ＣＴＴ　ＣＧＴ　Ｔ（配列番号４４）
８４５４４１

順行：ＣＣＴ　ＧＡＧ　ＧＴＴ　ＣＴＣ　ＣＧＡ　ＧＡＴ　Ｇ（配列番号４５）
逆行：ＴＣＣ　ＡＧＣ　ＣＣＧ　ＡＡＡ　ＴＴＣ　ＴＣＴ　ＧＴ（配列番号４６）
６８６０５
順行：ＣＡＡ　ＧＡＧ　ＧＣＧ　ＧＡＡ　ＧＧＧ　ＴＡＡ　Ａ（配列番号４７）
逆行１：ＣＡＧ　ＣＣＧ　ＣＴＣ　ＧＧＧ　ＴＡＧ　ＧＴ（配列番号４８）
逆行２：ＣＡＣ　ＴＡＴ　ＧＧＡ　ＡＧＧ　ＡＣＣ　ＴＴＧ　ＣＴ（配列番号４９）
８３８６３６
順行：ＧＧＡ　ＴＡＣ　ＡＧＧ　ＴＧＴ　ＡＧＧ　ＴＡＡ　ＡＴＣ（配列番号５０）
逆行：ＴＣＣ　ＣＡＧ　ＡＴＴ　ＡＧＧ　ＡＡＴ　ＴＴＡ　ＴＧＴ　Ａ（配列番号５１）
３４５０７７
順行：ＣＴＴ　ＣＴＧ　ＧＡＡ　ＣＡＧ　ＧＣＧ　ＡＡＧ　Ａ（配列番号５２）
逆行１：ＧＣＴ　ＧＧＣ　ＣＣＡ　ＧＡＣ　ＧＡＣ　ＧＡＡ（配列番号５３）
逆行２：ＧＣＡ　ＧＡＣ　ＡＣＡ　ＣＧＴ　ＧＧＡ　ＴＧＧ　Ｔ（配列番号５４）
８２５２１４
順行：ＧＡＴ　ＧＡＡ　ＧＴＴ　ＡＡＡ　ＴＣＣ　ＴＣＣ　ＴＴＴ　Ｇ（配列番号５５）
逆行：ＣＣＴ　ＣＴＴ　ＣＴＧ　ＴＧＣ　ＴＧＴ　ＣＡＣ　ＴＴ（配列番号５６）
２９７３９２
順行：ＣＣＴ　ＧＣＡ　ＡＧＡ　ＡＧＡ　ＧＣＴ　ＧＣＴ　Ｇ（配列番号５７）
逆行：ＣＡＣ　ＡＧＣ　ＴＧＴ　ＣＣＴ　ＧＧＣ　ＡＴＣ　Ａ（配列番号５８）
８９７５９４
順行：ＡＧＣ　ＡＣＣ　ＡＧＣ　ＡＣＴ　ＧＧＣ　ＴＣＡ　ＴＣＡ　Ａ（配列番号１０９）
逆行：ＡＧＡ　ＧＣＣ　ＡＧＡ　ＡＧＡ　ＧＣＴ　ＧＣＴ　Ａ（配列番号１１０）
７１３８８６
順行：ＡＡＣ　ＣＧＡ　ＣＡＡ　ＧＴＧ　ＴＧＡ　ＣＡＡ　ＣＴ（配列番号１１１）’
逆行：ＴＧＴ　ＧＣＣ　ＴＴＧ　ＣＧＧ　ＧＣＡ　ＧＴＡ（配列番号１１２）
８８４８６７
順行：Ｃ　ＡＣＣ　ＡＣＣ　ＡＣＣ　ＡＣＣ　ＡＡＡ　ＴＧＡ　Ａ（配列番号１１３）
逆行：ＣＡ　ＴＣＣ　ＡＴＴ　ＣＧＡ　ＣＧＣ　ＣＴＴ　ＴＧＡ（配列番号１１４）
３２１２４７
順行：ＣＣＡ　ＧＣＡ　ＧＣＡ　ＣＡＧ　ＴＣＡ　ＡＣＡ　ＡＡ（配列番号１１５）
逆行：ＴＧＧ　ＴＡＧ　ＣＴＴ　ＣＴＧ　ＣＴＴ　ＣＡＣ　ＡＡ（配列番号１１６）
１６３０９９８
順行：ＣＣＡ　ＧＡＧ　ＣＴＧ　ＣＡＣ　ＴＣＡ　ＴＴＣ　Ｃ（配列番号１１７）
逆行：ＣＡＣ　ＴＧＴ　ＴＧＧ　ＴＧＡ　ＴＡＡ　ＡＧＣ　ＡＡＴ　Ｔ（配列番号１１８）
７５６５９５
順行：ＧＧＡ　ＴＡＡ　ＡＧＧ　ＣＴＡ　ＣＴＴ　ＡＡＣ　ＡＡＡ　Ｇ（配列番号１１９）
逆行：ＣＣＡ　ＣＴＴ　ＴＧＣ　ＣＡＴ　ＣＴＣ　ＴＡＣ　ＡＣ（配列番号１２０）
５４９７２８
順行：ＧＡＧ　ＣＣＧ　ＡＧＧ　ＡＧＧ　ＴＴＧ　ＡＡＡ　Ｇ（配列番号１２１）
逆行：ＣＴＣ　ＣＴＣ　ＴＧＧ　ＧＴＣ　ＴＡＴ　ＡＧＴ　ＧＴ（配列番号１２２）
２０３００３
順行：ＧＡＣ　ＣＣＴ　ＧＧＴ　ＧＧＣ　ＧＧＴ　ＧＡＡ（配列番号１２３）
逆行：ＧＧＴ　ＧＣＣ　ＴＧＣ　ＡＧＣ　ＡＴＣ　ＴＴＣ　Ａ（配列番号１２４）
８１４７３１
順行：ＧＧＡ　ＧＡＧ　ＣＣＣ　ＴＧＧ　ＣＡＣ　ＧＴＡ（配列番号１２５）
逆行：ＣＣＴ　ＴＣＡ　ＴＣＴ　ＧＣＡ　ＧＧＴ　ＴＣＴ　ＴＧ（配列番号１２６）
７１４１９６

順行：ＡＣＧ　ＡＣＧ　ＧＡＣ　ＡＣＡ　ＴＴＡ　ＡＴＴ　ＡＣＴ（配列番号１２７）
逆行：ＴＣＣ　ＡＴＧ　ＣＴＧ　ＣＡＧ　ＣＴＧ　ＡＴＧ　Ａ（配列番号１２８）
８０９７８４
順行：Ｃ　ＣＴＴ　ＣＧＧ　ＣＡＡ　ＡＧＧ　ＧＡＧ　ＡＧＴ（配列番号１２８）
逆行：ＣＴＧ　ＧＡＴ　ＧＡＧ　ＴＴＣ　ＡＧＡ　ＧＡＧ　ＴＴＴ（配列番号１３０）
８２５２９３
順行：ＧＣＣ　ＴＣＧ　ＡＣＡ　ＧＧＣ　ＡＧＡ　ＧＡＴ（配列番号１３１）
逆行：ＣＴＴ　ＧＴＡ　ＧＣＴ　ＧＡＡ　ＧＡＴ　ＧＴＣ　ＡＡＴ（配列番号１３２）
２４６１２０
順行：ＣＴＣ　ＴＡＴ　ＧＣＣ　ＣＧＧ　ＧＡＣ　ＡＡＧ　Ｔ（配列番号１３３）
逆行：ＡＡＧ　ＡＣＡ　ＴＧＴ　ＣＧＡ　ＡＧＣ　ＣＡＴ　ＡＣＡ　（配列番号１３４）
’

シスプラチンに対して抵抗性の卵巣がん細胞で上方制御または下方制御される遺伝子の概要

ＥＦハンドタンパク質をコードしている遺伝子

カルシウムにより活性化されるＥＦハンドタンパク質をコードする５種の遺伝子、すなわち、Ｓ１００Ａ１０、Ｓ１００Ａ１１、ＳＰＡＲＣ、カルパイン２、およびグランカルシンが同定された。４種の遺伝子のうちの２種、すなわちＳ１００Ａ１０およびＳ１００Ａ１１は、第１染色体の１ｑ２１に互いに隣接して位置している（ペイヨヴィッチ（Ｐｅｊｏｖｉｃ）、１９９５年、Ａｎｎ．Ｍｅｄ．第２７巻、７３～７８ページ；リーディンガーら（Ｒｉｄｉｎｇｅｒ　ｅｔ　ａｌ．）、１９９８年、Ｂｉｏｃｈｉｍｉｃａ　ｅｔ　Ｂｉｏｐｈｙｓｉｃａ　Ａｃｔａ　第１４４８巻、２５４～２６３ページ）。第１染色体のこの領域は、卵巣がんにおける染色体再編成の温床の１つとして報告されている（ペイヨヴィッチ（Ｐｅｊｏｖｉｃ）、１９９５年、Ａｎｎ．Ｍｅｄ．第２７巻、７３～７８ページ）。Ｓ１００Ａ１０およびＳ１００Ａ１１の正確な生物学的機能は分かっていない。Ｓ１００Ａ１０およびＳ１００Ａ１１はいずれも、より抵抗性の高い卵巣がん細胞株においてより高いレベルで発現される（それぞれ図１および図２を参照のこと）。図３は、Ｓ１００Ａ１０およびＳ１００Ａ１１のｍＲＮＡも、化学療法に対する反応性の高い患者と比較すると、抵抗性がより高い患者では上昇していることを示す。

【００９９】

ＳＰＡＲＣ（オステオネクチンおよびＢＭ４０としても知られている）は分泌タンパク質である（レーンおよびセージ（Ｌａｎｅ　ａｎｄ　Ｓａｇｅ）、１９９４年、ＦＡＳＥＢ　Ｊ．第８巻、１６３～１７３ページ）。ＳＰＡＲＣは、腫瘍性卵巣の間質で高度に発現されることが示されており（ペイリーら（Ｐａｌｅｙ　ｅｔ　ａｌ．）、２０００年、Ｇｙｎｅｃｏｌｏｇｉｃ　Ｏｎｃｏｌｏｇｙ　第７８巻、３３６～３４１ページ）、また、卵巣がん細胞でアポトーシスを誘発することが示されている（イウら（Ｙｉｕ　ｅｔ　ａｌ．）、２００１年、Ａｍ．Ｊ．Ｐａｔｈｏｌ．第１５９巻、６０９～６２２ページ）。しかし、高レベルのＳＰＡＲＣが、黒色腫（レッダら（Ｌｅｄｄａ　ｅｔ　ａｌ．）、１９９７年、Ｊ．Ｉｎｖｅｓｔ．Ｄｅｒｍａｔｏｌ．第１０８巻、２１０～２１４ページ）および結腸直腸がん（ポルトら（Ｐｏｒｔｅ　ｅｔ　ａｌ．）、１９９５年、Ｉｎｔ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ　第６４巻、７０～５ページ）において検出されており、また、前立腺がん（トーマスら（Ｔｈｏｍａｓ　ｅｔ　ａｌ．）、２０００年、Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．第６巻、１１４０～９ページ）および神経膠芽腫（ゴレムビースキーら（Ｇｏｌｅｍｂｉｅｓｋｉ　ｅｔ　ａｌ．）、１９９９年、Ｉｎｔ．Ｊ．Ｄｅｖ．Ｎｅｕｒｏｓｃｉ．第１７巻、４６３～７２ページ）において細胞の遊走および浸潤を促進することも報告されている。ＳＰＡＲＣの過剰発現は、乳がん細胞の運動性および浸潤の増大にも寄与する（ブリッグスら（Ｂｒｉｇｇｓ　ｅｔ　ａｌ．）、２００２年、Ｏｎｃｏｇｅｎｅ　第２１巻、７０７７～９１ページ）。本明細書で示すように、ＳＰＡＲＣは、化学療法抵抗性のより高い卵巣がん細胞株においてはより高いレベルで発現されることが発見された（図４）。図５で示すように、腫瘍が再発していた患者から採取した試料においても

、ＳＰＡＲＣのｍＲＮＡは増加していた。

【０１００】

カルパイン２はカルシウム活性化プロテアーゼである。カルパイン２活性の阻害因子が、ヒトの急性リンパ芽球性白血病および非ホジキンリンパ腫、ならびに固形腫瘍細胞においてアポトーシスを誘発することが最近報告された（ファンおよびワン（Ｈｕａｎｇ ａｎｄ Ｗａｎｇ）、２００１年、ＴＲＥＮＤＳ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ 第７巻、３５５ページ）。カルパイン２のｍＲＮＡレベルは、化学療法抵抗性のより高い卵巣がん細胞株で上昇していた（図６）。

【０１０１】

グランカルシンは、ＥＦハンドタンパク質のペンタＥＦハンドサブファミリーに属する、最近報告されたＣａ$^{2+}$結合タンパク質であり、Ｃａ$^{2+}$が結合すると膜に移行する（ロリークら（Ｌｏｌｌｉｋｅ ｅｔ ａｌ．）、２００１年、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．第２７６巻、１７７６２～９ページ）。グランカルシンｍＲＮＡは、シスプラチンを用いた治療に対して反応性がより高い細胞株と比べて、シスプラチンに対する抵抗性がより高い細胞株において増加していることが発見された（図７）。

【０１０２】

タンパク質の翻訳および翻訳制御に関与するタンパク質をコードする遺伝子

ＭｅｔＡＰ２：メチオニンアミノペプチダーゼ２（ｅＩＦ－２が結合したｐ６７としても知られている）の発現は、卵巣がんに関連づけられたことはなかった。この遺伝子によってコードされているタンパク質は、２つの機能を有しているようである。同タンパク質は、新しく合成されたタンパク質から最初のメチオニンを除去し（リおよびチャン（Ｌｉ ａｎｄ Ｃｈａｎｇ）、１９９６年、Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍｕｎ．第２２７巻、１５２～９ページ）、また、真核生物の開始因子２α（ｅＩＦ－２α；ＧＴＰ結合タンパク質）にも結合し、そのリン酸化を阻害する（ウーら（Ｗｕ ｅｔ ａｌ．）、１９９３年、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．第２６８巻、１０７９６～１０８０１ページ）。ＭｅｔＡＰ２に対する抗体を用いると、ＭｅｔＡＰ２の発現は、抵抗性の最も高い細胞株ＯＶＣＡ４２９で増大されており、Ｈｅｙ（シスプラチン感受性が最も高い細胞株；図８を参照のこと）で下方制御されているようである。さらに、シスプラチン系の化学療法に対する抵抗性のレベルが異なる３名の患者から得た組織試料でＭｅｔＡＰ２のｍＲＮＡ発現を調べると、ＭｅｔＡＰ２は、化学療法に対する抵抗性が中間レベルの患者（ＣＡＰ２；図９）および低レベルの患者（ＣＡＰ１；図９）と比較して、最も抵抗性の高い患者（図９のＣＡＰ３）から得た試料において最も増大しているようであった。ＭｅｔＡＰ２を特異的標的とする薬物ＴＮＰ－４７０は、現在、いくつかのヒトの腫瘍における血管新生阻害剤として臨床試験中である（クルガーおよびフィグ（Ｋｒｕｇｅｒ ａｎｄ Ｆｉｇｇ）、２０００年、Ｅｘｐｅｒｔ Ｏｐｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔｉｇ．Ｄｒｕｇｓ 第９巻、１３８３～９６ページ）。さらに、アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いてＭｅｔＡＰ２の細胞内レベルを低下させると、アポトーシスを誘発することが示されている（ダッタおよびダッタ（Ｄａｔｔａ ａｎｄ Ｄａｔｔａ）、１９９９年、Ｅｘｐ．Ｃｅｌｌ Ｒｅｓ．第２４６巻、３７６～８３ページ）。これらの観察結果は、このタンパク質が卵巣がん治療の重要な標的となり得ることを示唆する。

【０１０３】

ｅＩＦ５は、ＧＴＰアーゼ活性化タンパク質として機能する、翻訳開始およびタンパク質合成の別の中心的タンパク質である（ポーリンら（Ｐａｕｌｉｎ ｅｔ ａｌ．）、２００１年、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｂｉｏｌ．第１１巻、５５～９ページ；ダスら（Ｄａｓ ｅｔ ａｌ．）、２００１年、Ｊ．Ｂｉｏ．Ｃｈｅｍ．第２７６巻、６７２０～６ページ）。２種類の転写物が検出され、どちらの発現レベルも、シスプラチンに対する抵抗性が最も高レベルの卵巣がん細胞株（図１０）および抵抗性のより高い患者（図１１）において上昇していた。

【０１０４】

ｅＩＦ２ＢεのｍＲＮＡは、シスプラチンに対して最も高い抵抗性を示す卵巣がん細胞

株において上方制御されている（図１２）。この遺伝子によってコードされるタンパク質は、５つのサブユニットからなるグアニンヌクレオチド交換因子複合体の調節性のεサブユニットである（プラウド（Ｐｒｏｕｄ）、２００１年、Ｐｒｏｇ．Ｍｏｌ．Ｓｕｂｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．第２６巻、９５～１１４ページ）。

【０１０５】

ｅＥＦ１イプシロンのｍＲＮＡは、シスプラチンに対して最も高い抵抗性を示す卵巣がん細胞株において下方制御されていた（図１３）。ｅＥＦは、ポリペプチドのアセンブリに関与している（ブラウンおよびプラウド（Ｂｒｏｗｎｅ ａｎｄ Ｐｒｏｕｄ）、２００２年、Ｅｕｒ．Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．第２６９巻、５３６０～８ページ）。

【０１０６】

キナーゼ：

ＳＡＰＫ／Ｅｒｋキナーゼ１は、ＪＮＫ１、ＪＮＫ２、およびｐ３８を活性化するがＥｒｋ１およびＥｒｋ２は活性化しない２重特異性キナーゼである（クエンダ（Ｃｕｅｎｄａ）、２０００年、Ｉｎｔ．Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ．第３２巻、５８１～７ページ）。この遺伝子およびそのタンパク質は、これまでは卵巣がんには関連づけられていなかった。この遺伝子のｍＲＮＡレベルは、感受性のより高い細胞株と比べて、抵抗性のより高い細胞株において上昇していることが見出された（図１４）。

【０１０７】

ＴＥＳＫ２：このセリン／トレオニンキナーゼは、主に細胞核内に位置している。しかし、不活性なときは細胞質に移動する。ＴＥＳＫ２はコフィリンを（Ｓｅｒ３で）特異的にリン酸化するが、コフィリンは、アクチン脱重合因子とともに、アクチンフィラメントの脱重合および切断を促進することにより、アクチンフィラメントの迅速な代謝回転およびアクチンに基づく再編成において極めて重要な役割を果たしているタンパク質である（十島（Ｔｏｓｈｉｍａ）、２００１年、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．第２７６巻、３１４４９～５８ページ）。卵巣がんに対する関連は、これまで報告されていなかった。ＴＥＳＫ２のｍＲＮＡは、抵抗性のより高い細胞株において増大されている（図１５）。

【０１０８】

ＦＡＳＴキナーゼ：これは、Ｆａｓによって媒介されるアポトーシスに関与していると考えられているＦａｓ活性化セリン／トレオニンキナーゼである（ティアンら（Ｔｉａｎ ｅｔ ａｌ．）、１９９５年、Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．第１８２巻、８６５～７４ページ）。ＦＡＳＴキナーゼのｍＲＮＡは、化学療法抵抗性のより高い細胞株において増大されている（図１６）

その他：

ＫＬＫ６：これは、ザイムおよびニューロシンとしても知られているセリンプロテアーゼである。この遺伝子は、ヒトのカリクレイン遺伝子ファミリーに属し、この遺伝子ファミリーは、すでに前立腺がんのマーカーとして使用されている前立腺特異抗原（ＰＳＡ）などの良く知られた分子も含み、また、卵巣がんのマーカーとしても調査されている（ディアマンディス（Ｄｉａｍａｎｄｉｓ）、２０００年、Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｂｉｏｃｈｅｍ．第３３巻、５７９～８３ページ）。正常な対照と比べて、卵巣がん患者においてＫＬＫ６の血清レベルが上昇していることが報告されている（ディアマンディス（Ｄｉａｍａｎｄｉｓ）、２０００年、Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｂｉｏｃｈｅｍ．第３３巻、５７９～８３ページ）。この遺伝子の発現レベルは、試験した化学療法抵抗性のより高い細胞株において上昇していた（図１７）。この遺伝子が、卵巣がんにおいて染色体再編成の頻度の高い別の領域に位置していることも注目に値する（ペイヨヴィッチ（Ｐｅｊｏｖｉｃ）、１９９５年、Ａｎｎ．Ｍｅｄ．第２７巻、７３～７８ページ）。 ＨＭＴ１（ＰＲＭＴ１としても知られている）：この遺伝子は、タンパク質のアルギニンＮ－メチルトランスフェラーゼをコードし、そのバリアント２種の発現は、乳がんで下方制御されていることが発見された（スコーリスら（Ｓｃｏｒｌｉｓ ｅｔ ａｌ．）、２０００年、Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍｕｎ．第２７８巻、３４９～５９ページ）。

【０１０９】

ＨＭＴ１発現は、シスプラチンに対する抵抗性がより高い細胞において下方制御されていた（図１８を参照のこと）。ＨＭＴ１が、ＫＬＫ６をコードしている遺伝子が存在するのと同じ染色体領域内の第１９染色体上の１９ｑ１３．３に位置していることに注目することも興味深い。

【０１１０】

ＡＲＡ９（アリール炭化水素受容体相互作用タンパク質（ＡＩＰ）およびＸＡＰ２としても知られている）は、ＡＨＲ媒介シグナル伝達においてある役割を果たしていると考えられている（カズラウスカスら（Ｋａｚｌａｕｓｋａｓ　ｅｔ　ａｌ．）、２００２年、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．第２７７巻、１１７９５～８０１ページ）。この遺伝子に由来するｍＲＮＡは、シスプラチンに対する抵抗性がより高い細胞株において増加していた（図１９）。ＡＲＡ９も、卵巣がんに関連づけられている染色体再編成の頻度の高い別の領域である第１１染色体上（１１ｑ１３．３）に位置している（ペイヨヴィッチ（Ｐｅｊｏｖｉｃ）、１９９５年、Ａｎｎ．Ｍｅｄ．第２７巻、７３～７８ページ）。

【０１１１】

カルポニン２は、筋上皮がんにおいて研究されてきたが（モスンジャックら（Ｍｏｓｕｎｊａｃ　ｅｔ　ａｌ．）、２０００年、Ｄｉａｇｎ．Ｃｙｔｏｐｈａｔｈｏｌ．第２３巻、１５１～５ページ）卵巣がんでは研究されていない。カルポニン２の発現は、シスプラチン感受性のより高い卵巣がん細胞株と比べて、抵抗性のより高い細胞株においてわずかに増加していた（図２０）。

【０１１２】

神経細胞アポトーシス阻害タンパク質（ＮＡＩＰ）は、シスプラチン抵抗性の最も高い細胞株においてわずかに下方制御されていることが分かった（図２１）。ＮＡＩＰは、卵巣がんと関連づけられたことはなかった（タムら（Ｔａｍｍ　ｅｔ　ａｌ．）、２０００年、Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．第６巻、１７９６～１８０３ページ）。

【０１１３】

ＲＮＡ結合タンパク質Ｓ１（ＲＮＰＳ１）は、ｍＲＮＡ前駆体スプライシングの一般的な活性化因子であり、アポトーシスの促進に関与しているＡＳＡＰおよびＳＡＲＴ３腫瘍拒絶抗原との複合体を形成することができる（シュベルクら（Ｓｃｈｗｅｒｋ　ｅｔ　ａｌ．）、２００３年、Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌ．第２３巻、２９８１～９０ページ；原田ら（Ｈａｒａｄａ　ｅｔ　ａｌ．）、２００１年、Ｉｎｔ．Ｊ　Ｃａｎｃｅｒ　第９３巻、６２３～８ページ）。ＲＮＰＳ１のレベルは、シスプラチン抵抗性の細胞株において上昇していることが分かった（図２２）。

【０１１４】

熱ショック転写因子（ＨＳＦ２）は、熱ショックタンパク質の遺伝子の発現を調節する（マシューら（Ｍａｔｈｅｗ　ｅｔ　ａｌ．）、１９９８年、Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌ．第１８巻、５０９１～８ページ）。ＨＳＦ２は、その調節サブユニットＰＲ６５との結合に関してタンパク質ホスファターゼ２Ａ（ＰＰ２Ａ）の触媒サブユニットと競合することもできるようであり、新規のＰＰ２Ａ調節タンパク質として作用すると考えられている（ホンら（Ｈｏｎｇ　ｅｔ　ａｌ．）、２０００年、Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍｕｎ．第２７２巻、８４～９ページ）。ＨＳＦ２のｍＲＮＡレベルは、抵抗性のより高い細胞株において上昇していた（図２３）。

【０１１５】

ＷＤＲ１：ＷＤ反復タンパク質は全ての真核生物に存在し、シグナル伝達、転写、および増殖を含めて、多種多様な細胞機能の調節において重要な役割を果たしている（リら（Ｌｉ　ｅｔ　ａｌ．）、２０００年、Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍｕｎ．第２７４巻、１１７～２３ページ）。しかし、ＷＤＲ１の正確な機能は分かっていない。この遺伝子のｍＲＮＡは、感受性のより高い細胞株と比べて、抵抗性のより高い細胞株において増加していた（図２４）。

【０１１６】

Ｆｔ１：この遺伝子のオープンリーディングフレームは、ユビキチン結合酵素に対する

類似性を示しており、マウスでは、Ｒｂ関連ｐ１３０遺伝子の近くに位置している（レシェら（Ｌｅｓｃｈｅ　ｅｔ　ａｌ．）、１９９７年、Ｍａｍｍ．Ｇｅｎｏｍｅ　第８巻、８７９～８３ページ）。細胞遺伝学的には、Ｆｔ１は、ヒトのがんにおいて繰り返し改変される領域である第１６染色体の１６ｑ１２．２領域に位置している。卵巣がんのこの染色体領域では、ヘテロ接合性の喪失が報告されている。Ｆｔ１のｍＲＮＡレベルは、シスプラチンに対する抵抗性がより高い細胞株において上昇していた（図２５）。

【０１１７】

ＮＭＥ４（ｎｍ２３－ｈ４としても知られている）は、腎細胞がんで中程度に過剰発現され、結腸直腸がんで強く過剰発現されるヌクレオシド二リン酸キナーゼである（ハイアーら（Ｈａｙｅｒ　ｅｔ　ａｌ．）、２００１年、Ａｎｔｉｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．第２１巻、２８２１～５ページ）。ＮＭＥ４のｍＲＮＡは、抵抗性のより高い細胞株において上昇していた（図２６）。

【０１１８】

ＡＤＡＲ１：ＡＤＡＲ１などのアデノシンデアミナーゼによりアデノシンからイノシンへとＲＮＡが編集されると、別のスプライシング部位が作られたり、コドンが変わったりするので、タンパク質の機能に変化が生じる（ワンら（Ｗａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．）、２０００年、Ｓｃｉｅｎｃｅ　第２９０巻、１７６５ページ）。ＡＤＡＲ１遺伝子が、Ｓ１００Ａ１０およびＳ１００Ａ１１と同じ頻繁に再編成される染色体領域内である、第１染色体上の１ｑ２１．１～ｑ２１．２に位置していることに注目することも興味深い（ペイヨヴィッチ（Ｐｅｊｏｖｉｃ）、１９９５年、Ａｎｎ．Ｍｅｄ．第２７巻、７３～７８ページ）。ＡＤＡＲ１のｍＲＮＡは、シスプラチンに対する抵抗性がより高い細胞株において上昇していた（図２７）。

【０１１９】

ＮＢＲ１：ＮＢＲ１の正確な分子機能は分かっていない。（当業者には、本発明の方法における遺伝子の有用性は、ある遺伝子の機能特性についての詳細または正確な概念に依存するものではないことが理解されよう。）マッピング研究により、ＮＢＲ１遺伝子はＢＲＣＡ１遺伝子と非常に近接して位置していることが明らかになった（ホワイトハウスら（Ｗｈｉｔｅｈｏｕｓｅ　ｅｔ　ａｌ．）、２００２年、Ｅｕｒ．Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．第２６９巻、５３８～４５ページ）。ＮＢＲ１の卵巣がんとの関連は報告されていない。ＮＢＲ１のｍＲＮＡは、シスプラチンに対する抵抗性が最も高い細胞株ＯＶＣＡ４２９において増大していた（図２８）。

【０１２０】

亜鉛フィンガータンパク質２６２／ＭＹＭ：ＭＹＭ亜鉛結合モチーフを含むタンパク質をコードする遺伝子ファミリーのメンバーである（スメドレーら（Ｓｍｅｄｌｅｙ　ｅｔ　ａｌ．）、１９９９年、Ｇｅｎｏｍｉｃｓ　第６０巻、２４４～７ページ）。このタンパク質は卵巣がんと関連づけられたことはなかったが、この遺伝子のｍＲＮＡは、試験した他の細胞株と比べて、化学療法抵抗性の最も高い細胞株において増大していた（図２９）。

【０１２１】

ＭＲＰＬ４：この遺伝子およびそのタンパク質は、卵巣がんに関連づけられたことはなかった。しかし、この遺伝子は、卵巣がんで頻繁に再編成される領域である第１９染色体の１９ｐ１３．２に位置している（ペイヨヴィッチ（Ｐｅｊｏｖｉｃ）、１９９５年、Ａｎｎ．Ｍｅｄ．第２７巻、７３～７８ページ）。ＭＲＰＬ４のｍＲＮＡは、化学療法抵抗性の細胞株において増大していた（図３０）。

【０１２２】

ＨＹＡ２２：この遺伝子およびそのタンパク質は、卵巣がんに関連づけられたことはなかった。しかし、この遺伝子は、卵巣がんでの染色体再編成に関連した領域である第３染色体の３ｐ２１．３に位置している（ペイヨヴィッチ（Ｐｅｊｏｖｉｃ）、１９９５年、Ａｎｎ．Ｍｅｄ．第２７巻、７３～７８ページ；プロトポポフら（Ｐｒｏｔｏｐｏｐｏｖ　ｅｔ　ａｌ．）、２００３年、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．第６３巻、４０４～１２ページ

；センチェンコら（Ｓｅｎｃｈｅｎｋｏ　ｅｔ　ａｌ．）、２００３年、Ｏｎｃｏｇｅｎｅ　第２２巻、２９８４～９２ページ）。ＨＹＡ２２のｍＲＮＡは、シスプラチンに対する感受性がより高い細胞株と比べて、抵抗性がより高い細胞株において増大していた（図３１）。

【０１２３】

ビネキシンβ：ＳＣＡＭ－１としても知られており、この遺伝子は、ビネキシンβ、ＣＡＰ／ポンシン、およびＡｒｇＢＰ２も含むタンパク質ファミリーに属するアダプタータンパク質をコードする（木岡ら（Ｋｉｏｋａ　ｅｔ　ａｌ．）、２００２年、Ｃｅｌｌ　Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ　ａｎｄ　Ｆｕｎｃｔｉｏｎ　第２７巻、１～７ページ）。ビネキシンが卵巣がんに関係していることは従来技術では知られていなかった。ビネキシンβのｍＲＮＡは、化学療法抵抗性の細胞株において増大されていた（図３２）。

【０１２４】

Ｇ－ＣＳＦＲ：顆粒球コロニー刺激因子受容体（Ｇ－ＣＳＦＲ）は、原発性の卵巣がんのほぼいたるところで発現される。しかし、そのリガンドのＧ－ＣＳＦの発現は、研究事例の半分でしか同じ細胞内でみとめられず、自己分泌系の存在が示唆された（サバレーゼら（Ｓａｖａｒｅｓｅ　ｅｔ　ａｌ．）、２００１年、Ｃａｎｃｅｒ　Ｌｅｔｔｅｒｓ　第１６２巻、１０５～１５ページ）。研究事例の別の３分の１では、Ｇ－ＣＳＦは間質に局在し、受容体を発現しているがん細胞に対して間葉細胞がリガンドを提供できる傍分泌系が存在し得ることが示唆された（サバレーゼら（Ｓａｖａｒｅｓｅ　ｅｔ　ａｌ．）、２００１年、Ｃａｎｃｅｒ　Ｌｅｔｔｅｒｓ　第１６２巻、１０５～１５ページ）。予備的な遡及評価から、自己分泌系を発現している卵巣がん患者と比べて、傍分泌ループのみを発現している患者の方が、全体的な生存率が悪いことが示唆された（サバレーゼら（Ｓａｖａｒｅｓｅ　ｅｔ　ａｌ．）、２００１年、Ｃａｎｃｅｒ　Ｌｅｔｔｅｒｓ　第１６２巻、１０５～１５ページ）。Ｇ－ＣＳＦおよびその受容体は、正常な卵巣および一部の両性の卵巣腫瘍においても共発現され得る。Ｇ－ＣＳＦＲのｍＲＮＡは、化学療法抵抗性の細胞株において増大していた（図３３）。

【０１２５】

ＳＲＢ１：ＣＬＡ－１としても知られており、この遺伝子は、負に帯電したリポソームおよびアポトーシス細胞の双方を認識する受容体をコードしている。腫瘍細胞は、アポトーシス細胞およびアポトーシス小体の取込みおよび除去に関与していることが報告されている（深澤ら（Ｆｕｋａｓａｗａ　ｅｔ　ａｌ．）、１９９６年、Ｅｘｐ．Ｃｅｌｌ　Ｒｅｓ．第２２２巻、２４６～５０ページ）。これらの観察結果の生物学的意義は良く理解されていない。ＳＲＢ１の発現と卵巣がんとの関連に関する開示はこれまでなかった。ＳＲＢ１のｍＲＮＡは、化学療法抵抗性の細胞株において増大していた（図３４）。

【０１２６】

ＩＧＦＢＰ－７：最近同定された、ＩＧＦ結合タンパク質のメンバーであり、このタンパク質は、比較的低い親和力でＩＧＦ－ＩおよびＩＧＦ－ＩＩに結合する（オー（Ｏｈ）、１９９８年、Ｂｒｅａｓｔ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．Ｔｒｅａｔ．第４７巻、２８３～９３ページ）ＩＧＦＢＰ－７のｍＲＮＡは、化学療法抵抗性の細胞株において増大していた（図３５）。

【０１２７】

ＲＡＢ２２Ａは、ＲａｓタンパクのＲＡＢサブファミリーに属している（カピら（Ｋａｕｐｐｉ　ｅｔ　ａｌ．）、２００２年、Ｊ．Ｃｅｌｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅ　第１１５巻、８９９～９１１ページ）。ＲＡＢ２２Ａのｍ ＲＮＡは、化学療法抵抗性の細胞株において減少し、シスプラチンに対する反応性がより高い細胞株において増大していた（図３６）。

【０１２８】

ＫＩＡＡ００８２：ＫＩＡＡ００８２は、公表された情報が無い完全長遺伝子である。この遺伝子のｍＲＮＡ発現は、シスプラチンに対して抵抗性である細胞株において増大していた（図３７）。

【０１２９】
ＮＣＯＲ２：これは、甲状腺ホルモン受容体に対する特異的な相互作用ドメインを有するＳＭＲＴに近縁なコリプレッサータンパク質である（ジェプセンおよびローゼンフェルド（Ｊｅｐｓｅｎ ａｎｄ Ｒｏｓｅｎｆｅｌｄ）、２００２年、Ｊ．Ｃｅｌｌ Ｓｃｉｅｎｃｅ 第１１５巻、６８９～９８ページ）。この遺伝子に対するｍＲＮＡ発現は、シスプラチンに対して感受性の細胞株と比べて、化学療法抵抗性の細胞株において低下していた（図３８）。
【０１３０】
ＭＴ１：メタロチオネイン１Ｌ（ＭＴ１）の正確な生理的役割はわかっていないが、以前の研究により、シスプラチンに対して抵抗性であるヒト卵巣がん細胞においてＭＴレベルが上昇していること（アンドリューおよびハウエル（Ａｎｄｒｅｗｓ ａｎｄ Ｈｏｗｅｌｌ）、１９９０年、Ｃａｎｃｅｒ Ｃｅｌｌｓ 第２巻、３５～４３ページ）、ならびにＭＴ遺伝子でトランスフェクトされた細胞がシスプラチンに対して抵抗性となったこと（中野ら（Ｎａｋａｎｏ ｅｔ ａｌ．）、２００３年、Ａｎｔｉｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．第２３巻、２９９～３０４ページ）が報告されている。ＭＴは、細胞質でシスプラチンを捕捉し、それによってシスプラチンに対する細胞の抵抗力を増大させる働きをすると考えられている（中野ら（Ｎａｋａｎｏ ｅｔ ａｌ．）、２００３年、Ａｎｔｉｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．第２３巻、２９９～３０４ページ）。逆説的に、ＭＴ１のｍＲＮＡレベルは、シスプラチンに対する感受性が最も高い細胞（Ｈｅｙ）において著しく上昇しているようであった（図５１）。
【０１３１】
ＭＰＰ１０：Ｍ期リンタンパク質（ＭＰＰ１０）は、大部分は細胞質タンパク質であるが、分泌されることも可能であり、ヒトのＵ３核内低分子リボ核タンパク質の構成成分である。このタンパク質の大半は、フィブリラリンと共に局在化しており（バセルガら（Ｂａｓｅｒｇａ ｅｔ ａｌ．）、１９９７年、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｓｙｍｐ．Ｓｅｒ．第３６巻、６４～７ページ）、ｒＲＮＡのプロセッシングに関与している。この遺伝子または該遺伝子の産物と卵巣がんとの関連は報告されていなかった。ＭＰＰ１０の発現レベルは、シスプラチンに対する感受性が高くなるにつれ上昇した（図５２）。
【実施例３】
【０１３２】
治療標的としてのＳＰＡＲＣのｉｎ ｖｉｔｒｏ試験
ＳＰＡＲＣは、試験した他の細胞株と比べて、シスプラチン抵抗性の最も高い細胞株（ＯＶＣＡ４２９）において最も高いレベルで発現された（図４）。このタンパク質が、接着を調節し、組織の再構築ならびに腫瘍の進行および侵襲性を促進する血管新生において重要な役割を果たし得るカルシウム結合性糖タンパク質であることは、当技術分野で公知である（レッダら（Ｌｅｄｄａ ｅｔ ａｌ．）、１９９７年、Ｊ．Ｉｎｖｅｓｔ．Ｄｅｒｍａｔｏｌ．第１０８巻、２１０～２１４ページ）。
【０１３３】
腫瘍縮小手術を受ける前の個体、および患者の腫瘍が再発していたときは手術から９ヵ月後の時点の個体から得たヒトの腹水試料においてＳＰＡＲＣ発現を試験した（図５；ＳＰＡＲＣについて観察される２種の転写物は、差次的なポリアデニル化に起因して生じる；レッダら（Ｌｅｄｄａ ｅｔ ａｌ．）、１９９７年、Ｊ．Ｉｎｖｅｓｔ．Ｄｅｒｍａｔｏｌ．第１０８巻、２１０～２１４ページ）。手術後のＳＰＡＲＣ発現レベルは大きく上昇しており、この患者の不良転帰と相関した。この観察結果は、他の形態の固形がんを研究している他のグループによって得られた研究結果とも一致しており（ゴレムビエスキーら（Ｇｏｌｅｍｂｉｅｓｋｉ ｅｔ ａｌ．）、１９９９年、Ｉｎｔ．Ｊ．Ｄｅｖ．Ｎｅｕｒｏｓｃｉ．第１７巻、４６３～７２ページ；ブリッグスら（Ｂｒｉｇｇｓ ｅｔ ａｌ．）、２００２年、Ｏｎｃｏｇｅｎｅ 第２１巻、７０７７～９１ページ；ファンおよびワン（Ｈｕａｎｇ ａｎｄ Ｗａｎｇ）、２００１年、ＴＲＥＮＤＳ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ 第７巻、３５５ページ；ロリークら（Ｌｏｌｌｉｋｅ

ｅｔ　ａｌ．）、２００１年、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．第２７６巻、１７７６２～９ページ）、ＳＰＡＲＣ発現の増大から、卵巣がんだけでなく他のタイプの固形がんにおける化学療法的治療の成功および疾患の進行を予測することができることが示唆された。

【０１３４】

最も抵抗性が高い卵巣がん細胞株であるＯＶＣＡ４２９においてＳＰＡＲＣタンパク質発現レベルを低下させると、シスプラチン抵抗性が低減されるかどうかを試験するために、ＳＰＡＲＣのメッセージの異なる領域を標的とするように３種のｓｉＲＮＡを設計した。使用したＳＰＡＲＣのｓｉＲＮＡは以下の：

＃１標的配列：ＡＡＴＣＣ　ＴＧＴ　ＣＣＡ　ＧＧＴ　ＧＧＡ　ＡＧＴ　Ａ（配列番号１）；

＃２標的配列：ＡＡＧＣＴ　ＣＣＡ　ＣＣＴ　ＧＧＡ　ＣＴＡ　ＣＡＴ　Ｃ（配列番号２）；および

＃３標的配列：ＡＡＴＧＡ　ＣＡＡ　ＧＴＡ　ＣＡＴ　ＣＧＣ　ＣＣＴ　Ｇ（配列番号３）

であった。

【０１３５】

本明細書で記述するｓｉＲＮＡ実験は、ｓｉＰＯＲＴ（商標）Ｌｉｐｉｄプロトコール（アンビオン社（Ａｍｂｉｏｎ））を用いて実施した。実験を実施する時点で細胞が３０～７０％コンフルエントになるように、トランスフェクションの２４時間前に、１０％ＦＢＳ含有ＭＥＭα培地中に細胞を播種した。ＦＢＳまたは抗生物質を含まない培地を用いて、ｓｉＰＯＲＴおよびｓｉＲＮＡの複合体を調製した。ｓｉＰＯＲＴについては、６ウェルのプレートにはウェル当たり４マイクロリットル、９６ウェルプレートにはウェル当たり０．５マイクロリットルとなるように培地に加え、ボルテックス処理して混合し、室温で２５分間インキュベートした。ｓｉＲＮＡについては、培地中で希釈した１～２５ｎＭ（通常は１２．５ｎＭを使用）の濃度のｓｉＲＮＡを使用した。ｓｉＰＯＲＴをｓｉＲＮＡ混合物に加え、穏やかに混合し、室温で２０分間インキュベートした。無血清培地で細胞を洗浄した後、プレートに細胞を加えた（９６ウェルプレートを使用する場合は、4.5×10^{4}の密度で細胞を播いた；６ウェルプレートを使用する場合は、$1\sim5\times10^{5}$の密度で細胞を播種した）。ｓｉＰＯＲＴ／ｓｉＲＮＡ複合体を各プレート／ウェルに加え、プレートを穏やかに揺り動かして細胞表面全体に複合体を行き渡らせた。通常の細胞培養条件のもとで４時間インキュベーションした後、１０％ＦＢＳを含有する追加の培地を細胞に加えた。４８時間後に、全ＲＮＡを抽出した。

【０１３６】

供給業者（アンビオン（Ａｍｂｉｏｎ）社）の取扱い説明書に従って、ｓｉＲＮＡ構築物で細胞をトランスフェクトした。６ウェルプレートの場合は、ウェル当たり１２．５ｎＭのｓｉＲＮＡをトランスフェクションに使用した。ｓｉＲＮＡのOD_{260}の測定を１：１００の希釈率で２連にて実施した。測定値を平均し、次に希釈係数を掛け、次いで４０を掛けて（OD_{260}の値１は４０μｇ／ｍｌのＲＮＡに等しい）、μｇ／ｍｌの単位でのｓｉＲＮＡの最終濃度を得た。その数値を１４（平均的な２１ｍｅｒのｄｓＲＮＡ１ナノモル中のＲＮＡのμｇ数）で割って、μＭの単位でのｓｉＲＮＡの最終濃度を得、次に、濃度がｎＭとなるように変換した。

【０１３７】

これらの研究の結果を図４８に示す。３種類のｓｉＲＮＡは全て、これらの細胞においてＳＰＡＲＣのｍＲＮＡレベルを低減させた。ｓｉＰＯＲＴのみ、またはｓｉＲＮＡ＃２のセンス鎖のみで処理した細胞は、ＳＰＡＲＣのｍＲＮＡ発現の有意な低減を示さなかった。しかし、３種のｓｉＲＮＡ全てを一緒に含む併用処理ではいくらか効果を示された（図４８）。

【０１３８】

ＳＰＡＲＣのｓｉＲＮＡの存在下でＯＶＣＡ４２９細胞がシスプラチンに抵抗する能力についても調べた。細胞は、ｓｉＰＯＲＴのみで処理するか、あるいは、ｓｉＲＮＡ＃２

のセンス鎖のみ、または完全なｓｉＲＮＡ＃２でトランスフェクトした。トランスフェクション後４８時間の間、これらの細胞を回復させ、次に、段階的に濃度を上げたシスプラチン、または対応する濃度の対照のＤＭＳＯで処理した。細胞を薬物に２４時間曝露させ、その後薬物を取り除き、さらに７２時間、細胞を回復させた。次に、細胞生存率に対するこの処理の効果をＭＴＴアッセイによって評価した。結果を図４９に示す；図５０は、細胞に対する効果を定量化した後のこれらの結果を示す。このデータは、シスプラチンに曝露させる前に完全なｓｉＲＮＡ＃２で細胞を処理すると、細胞の抵抗性のレベルが半分に低減することを示唆した（ｓｉＰＯＲＴのみ、またはセンス鎖のみで処理した対照ではIC_{50}が２５～５０μＭであるのに対し、ｓｉＲＮＡ＃２で処理した後はIC_{50}が～１２．５μＭとなった）。

【０１３９】

これらの実験の結果は、ＳＰＡＲＣが卵巣がんの治療標的およびマーカーであることを示した。

【実施例４】

【０１４０】

治療標的としてのＭｅｔＡＰ２／ｐ６７のｉｎ　ｖｉｔｒｏ試験

ＭｅｔＡＰ－２／ｐ６７　は、いずれも細胞増殖に重要な機能を有する二機能性タンパク質である（リおよびチャン（Ｌｉ　ａｎｄ　Ｃｈａｎｇ）、１９９６年、Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍｕｎ．第２２７巻、１５２～９ページ；ウーら（Ｗｕ　ｅｔ　ａｌ．）、１９９３年、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．第２６８巻、１０７９６～１０８０１ページ）。一方の役割では、このタンパク質は真核生物の開始因子２（ｅＩＦ－２）に結合してそのリン酸化を阻害し、また、他方の役割では、このタンパク質のＣ末端ドメインが、いくつかの細胞性タンパク質からのＮ末端メチオニンの加水分解を触媒する酵素活性を有している（ウーら（Ｗｕ　ｅｔ　ａｌ．）、１９９３年、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．第２６８巻、１０７９６～１０８０１ページ）。ｅＩＦ－２のリン酸化によりｅＩＦ－２の翻訳レパートリーが改変されて、様々なメッセージが様々なリン酸化状態で翻訳されるのが可能となる。さらに、メチオニンアミノペプチダーゼ活性は、一般にタンパク質の機能にとって重要であり、Ｎ末端メチオニンの除去が行われないと不活性なタンパク質が生成されることが多い（リおよびチャン（Ｌｉ　ａｎｄ　Ｃｈａｎｇ）、１９９６年、Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍｕｎ．第２２７巻、１５２～９ページ）。

【０１４１】

アスペルギルス・フミガーツス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｆｕｍｉｇａｔｕｓ）に由来するフマギリン、およびその合成アナログのＴＮＰ－４７０は、ＭｅｔＡＰ－２に共有結合してそのメチオニンアミノペプチダーゼ活性を阻害するが、近縁のＭｅｔＡＰ－１の活性は阻害しない（グリフィスら（Ｇｒｉｆｆｉｔｈ　ｅｔ　ａｌ．）、２９９８年、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　第９５巻、１５１８３～８ページ）。いくつかの異なる種類の細胞をフマギリンで処理すると、ＭｅｔＡＰ－２の発現が増大されたことに注目することも重要である（ワンら（Ｗａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．）、２０００年、Ｊ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．第７７巻、４６５～７３ページ）；これらの細胞は、ＭｅｔＡＰ－２の発現レベルを上昇させることによって、ＭｅｔＡＰ－２の機能喪失に適応していると考えられる。

【０１４２】

本明細書で記述する実験は、ＯＶＣＡ４２９が、シスプラチンに対する感受性が最も高い細胞株Ｈｅｙと比べて約７倍多くのＭｅｔＡＰ－２を発現することを示した（図８）。ノーザンブロット解析も、ＭｅｔＡＰ－２発現のレベルが、臨床的にシスプラチン系化学療法に対する抵抗性がより高い患者でも上昇していることを裏付けた。図９は、最も抵抗性の高い患者（ＣＡＰ３）のＭｅｔＡＰ－２のｍＲＮＡレベルが、最も抵抗性の低い患者（ＣＡＰ１）の約３倍高かったことを示す。シスプラチン系化学療法に対する抵抗性が中程度のレベルの患者も、中程度のレベルのＭｅｔＡＰ－２　ｍＲＮＡを示した。

【０１４３】
ＭＴＴによるアッセイを実施した。該アッセイでは、フマギリンのみ、シスプラチンのみ、および様々な濃度のシスプラチンとフマギリンの組合せを用いて、４、８、および２４時間、ＯＶＣＡ４２９細胞を処理した。結果を図４０、４１、および４２に示す。図４０（上側パネル）は、フマギリンの濃度上昇がＯＶＣＡ４２９細胞の生存率に与える効果を示す。細胞死がいくらか認められたが、細胞の８０％までは、フマギリンが極めて高濃度でも生存していた。シスプラチンのみで細胞を処理すると（下側パネル）、シスプラチンのＩＣ$_{50}$は約１００μＭとなった。段階的にレベルを上げたシスプラチンに加えて０．１μｇ／ｍｌのフマギリンが存在すると、ＩＣ$_{50}$は約５０μＭに低下した。しかし、１０μｇ／ｍｌのフマギリンの存在下で細胞をシスプラチンで処理すると、細胞生存率が高まり、ＩＣ$_{50}$は約２００μＭとなった。

【０１４４】
インキュベーション時間の長さにかかわらず、０．１μｇ／ｍｌのフマギリンの存在下ではシスプラチンの効果が増大されたが、１０μｇ／ｍｌのフマギリンの存在下で細胞をシスプラチンで処理したときは逆の効果が増大された（図４１および４２）。これらの観察結果から、フマギリンが低濃度であるときに好ましいバランスが保たれ、フマギリンがシスプラチンと相乗的に作用してより多くの細胞の死滅をもたらすことが示唆された。

【０１４５】
ＭｅｔＡＰ－２発現を抑制する効果を測定するために、ＭｅｔＡＰ－２メッセージの異なる領域を標的とするように３種類のｓｉＲＮＡを設計した（図４３）。これらのＭｅｔＡｐ－２のｓｉＲＮＡは、
＃１　標的配列：ＡＡＡＧＡ　ＴＣＡ　ＧＣＡ　ＴＴＧ　ＧＡＡ　ＧＡＴ　Ａ（配列番号４）
＃２　標的配列：ＡＡＧＣＡ　ＣＡＴ　ＣＧＡ　ＣＡＡ　ＧＴＴ　ＡＧＡ　Ａ（配列番号５）
＃３　標的配列：ＡＡＡＣＡ　ＧＴＧ　ＣＣＧ　ＡＴＴ　ＧＴＧ　ＡＡＡ　Ｇ（配列番号６）
であった。

【０１４６】
図４４は、ＯＶＣＡ４２９におけるＭｅｔＡＰ－２の発現レベルに対するｓｉＲＮＡ＃１の効果を示す。対照の細胞は、同じｓｉＲＮＡのセンス鎖のみでトランスフェクションするか、または、トランスフェクション剤（ｓｉＰｏｒｔ（商標）脂質）で処理した。ｓｉＲＮＡ＃１で細胞をトランスフェクションすると、トランスフェクション効率が１００％ではなかったにもかかわらず、ＭｅｔＡＰ－２の発現レベルは半分に低減された。これらの細胞のＧＡＰＤＨ発現レベルに対する効果はほとんど認められず、この処理によって遺伝子発現が一様に影響されるわけではないことが示された。さらに、ｓｉＲＮＡ＃２および＃３で細胞を処理しても、ＭｅｔＡＰ－２発現は低減されなかった。

【０１４７】
ｓｉＲＮＡ＃１、＃１のセンス鎖のみ、またはｓｉＰｏｒｔ脂質のみでＯＶＣＡ４２９細胞を処理することによって、ＭｅｔＡＰ－２の発現が妨害されたときの、シスプラチンに対するＯＶＣＡ４２９の抵抗性を試験した。ｓｉＲＮＡとともに４８時間インキュベーションした後、様々な濃度のシスプラチン、または対応する濃度のその溶媒すなわちＤＭＳＯに、細胞を２４時間曝露させた。この実験の結果を定量化し、図４５に示す。これらの結果は、ｓｉＲＮＡ＃１が存在すると、ＯＶＣＡ４２９のＩＣ$_{50}$が２５μＭから約３μＭに低下することを示した。図４６は、ＭＴＴアッセイを実施した後の９６ウェルプレートの写真を示す。

【０１４８】
総合すると、これらの結果は、ＭｅｔＡＰ－２が卵巣がんにおける治療処置の有用な標的であることを示した。

【実施例５】

【０１４９】
治療標的としてのカルパイン２およびＳ１００Ａ１０のｉｎ　ｖｉｔｒｏ試験、ならびにＯＶＣＡ４２９細胞におけるＳ１００Ａ１１発現の低減
５４９７２８（カルパイン２）
前述の方法を用いて、カルパイン２メッセージの異なる領域を標的とするように３種類のｓｉＲＮＡを設計した。これらのカルパイン２のｓｉＲＮＡは
＃１　ＡＡ　ＧＧＣ　ＡＴＡ　ＣＧＣ　ＣＡＡ　ＧＡＴ　ＣＡＡ　Ｃ（配列番号７）；
＃２　ＡＡ　ＡＣＴ　ＴＣＴ　ＴＣＣ　ＴＧＡ　ＣＧＡ　ＡＴＣ　Ｇ（配列番号８）；および
＃３　ＡＡ　ＡＣＧ　ＣＴＡ　ＴＴＣ　ＡＡＧ　ＡＴＡ　ＴＴＴ　Ａ（配列番号９）
であった。
【０１５０】
前述したようにして、各ｓｉＲＮＡをＯＶＣＡ４２９細胞に導入した。図５３は、これらの配列を用いたＯＶＣＡ４２９細胞におけるノックダウン実験の結果を示す。前述のプロトコールを用いることによって、配列＃１および＃３は、遺伝子の発現レベルを約５０％低下させた。さらに、ｓｉＲＮＡ＃３を含むＯＶＣＡ４２９細胞を様々な濃度のシスプラチンで処理した。通常、シスプラチンに２４時間曝露させた後のＯＶＣＡ４２９細胞のIC_{50}は、シスプラチン約２５μＭである。図５４に示すように、カルパイン２のｓｉＲＮＡ＃３は、IC_{50}を３．１２μＭに低減させ、それによって、シスプラチンに対する細胞の感受性を数倍増大させた。同様に、シスプラチンの存在下または不在下で、濃度を段階的に上げたカルパイン阻害因子Ｉ（ＡＬＬＮ）でＯＶＣＡ４２９細胞を処理した。図５５に示すように、ＡＬＬＮはシスプラチンの存在下でこれらの細胞のIC_{50}を１２．５μＭに低減させた。したがって、カルパイン２のｓｉＲＮＡ＃３は、シスプラチンに対するＯＶＣＡ４２９細胞の感受性に対してＡＬＬＮより大きな効果を有していた。
【０１５１】
７５６５９５（Ｓ１００Ａ１０）
Ｓ１００Ａ１０メッセージに対して３種類のｓｉＲＮＡ：
＃１　ＡＡ　ＡＴＧ　ＧＡＡ　ＣＡＣ　ＧＣＣ　ＡＴＧ　ＧＡＡ　Ａ（配列番号５９）；
＃２　ＡＡ　ＡＴＴ　ＣＧＣ　ＴＧＧ　ＧＧＡ　ＴＡＡ　ＡＧＧ　Ｃ（配列番号６０）；および
＃３　ＡＡ　ＴＡＡ　ＴＧＡ　ＡＧＧ　ＡＣＣ　ＴＧＧ　ＡＣＣ　Ａ（配列番号６１）
を作製した。
【０１５２】
図５６で示すように、ｓｉＲＮＡ＃３は、ＯＶＣＡ４２９細胞のIC_{50}をシスプラチン２５μＭから６．２５μＭに低減させ、それによって、細胞のシスプラチン感受性を増大させた。
【０１５３】
８１０６１２（Ｓ１００Ａ１１）　前述の方法を用いて、Ｓ１００Ａ１１メッセージの異なる領域を標的とするように３種類のｓｉＲＮＡを設計した。これらのＳ１００Ａ１１のｓｉＲＮＡは、
＃１　ＡＡ　ＡＧＧ　ＡＴＧ　ＧＴＴ　ＡＴＡ　ＡＣＴ　ＡＣＡ　Ｃ（配列番号１０）；
＃２　ＡＡ　ＧＡＡ　ＡＣＴ　ＧＧＡ　ＣＡＣ　ＣＡＡ　ＣＡＧ　Ｔ（配列番号１１）；および
＃３　ＡＡ　ＴＣＴ　ＧＡＴ　ＴＧＧ　ＴＧＧ　ＣＣＴ　ＡＧＣ　Ｔ（配列番号１２）
であった。
【０１５４】
前述したようにして、各ｓｉＲＮＡをＯＶＣＡ４２９細胞に導入した。図５７は、前述の方法を用いることによって、ｓｉＲＮＡ＃１および＃２がＯＶＣＡ４２９細胞における遺伝子の発現レベルをそれぞれ５０％および２５％低下させたことを示す。
【実施例６】

【０１５５】
結腸がんにおけるＭｅｔＡＰ－２、ＳＰＡＲＣ、カルパイン２、Ｓ１００Ａ１０、およびＳ１００Ａ１１の発現
市販の、５名の個体から単離された、非腫瘍組織および隣接する腫瘍組織から得られた対応する結腸ｃＤＮＡセットをＢＤバイオサイエンスインコーポレイテッド社（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｉｎｃ．）［米国カリフォルニア州サンホゼ（Ｓａｎ Ｊｏｓｅ）所在］から入手した。
【０１５６】
正常結腸組織および腫瘍結腸組織におけるＭｅｔＡＰ－２、ＳＰＡＲＣ、Ｓ１００Ａ１０、Ｓ１００Ａ１１、およびカルパイン２の発現レベルを決定するために、定量的リアルタイムＰＣＲ実験を実施した。図５８は、５対の対応する結腸ｃＤＮＡにおけるＭｅｔＡＰ－２の発現レベルを示す。このデータは、患者らのうち２名の腫瘍ｃＤＮＡにおける発現レベルが、対応する非腫瘍ｃＤＮＡと比べて著しく上昇していたことを示している（患者ＢおよびＣ；図５８）。別の１名の患者の腫瘍ｃＤＮＡにおける発現レベルは、対応する非腫瘍ｃＤＮＡと比べてわずかしか上昇していなかった（患者Ａ；図５８）。ＯＶＣＡ４２９における発現レベルを参照として使用した。以前の報告により、ＭｅｔＡＰ－２阻害因子ＴＮＰ－４７０によって、ヒト結腸がんの肝臓転移を防ぐことができることが示されている（田中ら（Ｔａｎａｋａ ｅｔ ａｌ．）、１９９５年、Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．第５５巻、８３６～９ページ）。
【０１５７】
図５９は、ＳＰＡＲＣのｍＲＮＡ発現レベルが、５つの対応腫瘍試料のうちの４つにおいて、対応する非腫瘍ｃＤＮＡと比べて上昇していたことを示す。図６０は、Ｓ１００Ａ１１のｍＲＮＡ発現レベルが、全ての対応腫瘍試料において、対応する非腫瘍ｃＤＮＡと比べて上昇していたことを示す。図６１は、Ｓ１００Ａ１０のｍＲＮＡ発現レベルが、５つの対応腫瘍試料のうちの４つにおいて、対応する非腫瘍ｃＤＮＡと比べて上昇していたことを示す。図６２は、カルパイン２のｍＲＮＡ発現レベルが、全ての対応腫瘍試料において、対応する非腫瘍ｃＤＮＡと比べて上昇していたことを示す。
【０１５８】
総合すると、これらの観察結果は、ＭｅｔＡＰ－２、ならびにＳＰＡＲＣ、Ｓ１００Ａ１１、Ｓ１００Ａ１０、およびカルパイン２が、結腸がん患者のための治療標的であることを示唆している。
【実施例７】
【０１５９】
血清中の分泌タンパク質を検出するためのサンドイッチＥＬＩＳＡ
９６ウェルマイクロタイタープレートのウェルを、目的の遺伝子産物に対して作製した抗体でコーティングした。一定量の精製した組換え標的遺伝子産物を段階希釈し、定量のための検量線を作成するのに使用する。次に、一定量の患者の血清を各ウェルに添加する。蒸発を最小限に抑えるためにプレートにカバーをかけ、数時間から一晩、４℃でインキュベートする。抗原を取り除き、リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）でウェルを３回洗浄する。３００μｌのブロッキング溶液（魚類ゼラチンの３％（ｗ／ｖ）ＰＢＳ溶液）を各ウェルに加え、室温で２時間インキュベートする。ブロッキング溶液を取り除き、ＰＢＳで３回、ウェルを洗浄する。次に、ホースラディッシュペルオキシダーゼに結合させた適切な抗体を各ウェルに加え（ウェル当たり１００μｌ）、室温で１～２時間インキュベートする。次に、抗体を取り除き、ＮＰ－４０溶液（ＮＰ－４０の０．０５％（ｖ／ｖ）ＰＢＳ溶液）でウェルを３回洗浄する。室温で３０分間、ＡＢＴＳ（ロックランドイムノケミカルズ（Ｒｏｃｋｌａｎｄ Ｉｍｍｕｎｏｃｈｅｍｉｃａｌｓ）社）を（ウェル当たり１００μｌで）各ウェルに加え、マイクロプレートリーダーを用いて４０５ｎｍでの吸光度を測定することによって、結合を検出する。ペルオキシダーゼの代わりにアルカリ性リン酸塩結合体を使用する場合は、結合を検出するために、ＡＢＴＳの代わりにｐＮＰＰ（ロックランドイムノケミカルズ（Ｒｏｃｋｌａｎｄ Ｉｍｍｕｎｏｃｈｅｍｉｃａｌｓ）社

）を使用する。

【０１６０】

精製タンパク質を用いて作成した検量線から検出限界を決定した後、がんに罹患していない数人の被験者、およびがんまたは良性の病態であると診断された数人の患者を試験して、目的の特定の遺伝子産物について予想される濃度範囲を決定する。がん患者についての予想範囲から、卵巣がん患者または疾患を再発している患者を、応答性の患者またはがんではない健康な被験者から特定または区別するために使用することができる境界が決まる。

【実施例８】

【０１６１】

ｓｉＲＮＡを介した遺伝子発現の「ノックダウン」：

上述のプロトコールに従って、いくつかの遺伝子に対して特異的なｓｉＲＮＡが、卵巣がん細胞株においてそれぞれの遺伝子を低減させる（または「ノックダウンする」）能力について試験した。各例において、試験対象のｓｉＲＮＡとＧＣ含有量が一致する対照の（非特異的な）ｓｉＲＮＡ（ダーマコンインコーポレイテッド社（Ｄｈａｒｍａｃｏｎ，Ｉｎｃ）［米国コロラド州ラフィエット（Ｌａｆａｙｅｔｔｅ）所在］から入手）に対して、いくつかのｓｉＲＮＡを試験した。いくつかの例では、陰性対照（処理なし）も含めた。発現ノックダウンのレベルはｓｉＲＮＡの種類によって変動した。特定の遺伝子および特定の遺伝子それぞれに対するｓｉＲＮＡ配列について以下に述べる。

【０１６２】

１．ＳＡＰＫ／Ｅｒｋ１（Ｌ３６８７０）に対して２種類のｓｉＲＮＡを作製した：

Ｌ３６８７０（７２６１４７）

標的配列＃１（配列番号６４）：ＡＡＡ　ＴＧＧ　ＧＡＣ　ＧＡＧ　ＧＡＧ　ＣＴＴ　ＡＴＧ（コード配列の第３２０塩基対から始まる）

標的配列＃２（配列番号６５）：ＡＡＧ　ＣＧＣ　ＡＴＣ　ＡＣＧ　ＡＣＡ　ＡＧＧ　ＡＴＡ（コード配列の第８３１塩基対から始まる）

いずれの配列もＳＡＰＫの発現を低減させるのに成功し、配列＃２はｍＲＮＡレベルを６０％低減させた。

【０１６３】

２．ｅＥＦ１ε（ＢＣ００５２９１）に対して３種類のｓｉＲＮＡを作製した：

ＢＣ００５２９１（３０６９２１）

標的配列＃１（配列番号６６）：ＡＡＣ　ＡＧＧ　ＡＴＴ　ＧＡＣ　ＴＡＣ　ＴＡＴ　ＡＧＣ（コード配列の第１２３塩基対から始まる）

標的配列＃２（配列番号６７）：ＡＡＴ　ＡＣＡ　ＧＧＧ　ＴＣＡ　ＣＴＣ　ＡＡＧ　ＴＡＧ（コード配列の第２２７塩基対から始まる）

標的配列＃３（配列番号６８）：ＡＡＡ　ＴＡＴ　ＣＴＴ　ＡＡＴ　ＧＴＧ　ＴＣＴ　ＣＧＣ（コード配列の第４１２塩基対から始まる）

標的配列＃１および＃２は、ｅＥＦ１εの発現を低減させるのに成功し、配列＃１はｍＲＮＡレベルを６５％低減させた。

【０１６４】

３．Ｇ－ＣＳＦＲ（Ｍ５９８１８）に対して３種類のｓｉＲＮＡを作製した：

Ｍ５９８１８（８０９６３９）

標的配列＃１（配列番号６９）：ＡＡＧ　ＴＧＴ　ＧＡＧ　ＣＴＧ　ＣＧＣ　ＣＡＣ　ＡＡＧ（コード配列の第７９３塩基対から始まる）

標的配列＃２（配列番号７０）：ＡＡＧ　ＡＧＣ　ＣＣＣ　ＣＴＴ　ＡＣＣ　ＣＡＣ　ＴＡＣ（コード配列の第１６６６塩基対から始まる）

標的配列＃３（配列番号７１）：ＡＡＣ　ＡＧＧ　ＡＡＧ　ＡＡＴ　ＣＣＣ　ＣＴＣ　ＴＧＧ（コード配列の第１９５７塩基対から始まる）

標的配列＃１および＃３は、Ｇ－ＣＳＦＲの発現レベルを低下させ、配列＃１はｍＲＮＡレベルを５３％低減させた。

【０１６５】
４．ＡＲＡ９／ＸＡＰ２（Ｕ３１９１３）に対して３種類のｓｉＲＮＡを作製した：
Ｕ３１９１３（８１４７３１）
標的配列＃１（配列番号７２）：ＡＡＡ　ＣＧＴ　ＧＴＧ　ＡＴＡ　ＣＡＧ　ＧＡＡ　ＧＧＣ（コード配列の第４８塩基対から始まる）
標的配列＃２（配列番号７３）：ＡＡＣ　ＡＡＧ　ＴＡＣ　ＧＡＣ　ＧＡＣ　ＡＡＣ　ＧＴＣ（コード配列の第７７５塩基対から始まる）
標的配列＃３（配列番号７４）：ＡＡＣ　ＧＴＣ　ＡＡＧ　ＧＣＣ　ＴＡＣ　ＴＴＣ　ＡＡＧ（コード配列の第７９０塩基対から始まる）
標的配列＃２および＃３は、ＡＲＡ９発現の低減をもたらし、配列＃３はｍＲＮＡレベルを５０％低減させた。

【０１６６】
５．ＲＮＰＳ１（ＡＦ０１５６０８）に対して３種類のｓｉＲＮＡを作製した：
ＡＦ０１５６０８（８９７５９４）
標的配列＃１（配列番号７５）：ＡＡＴ　ＡＴＴ　ＣＡＴ　ＡＣＧ　ＧＣＡ　ＴＧＧ　ＡＣＴ（コード配列の第３２７塩基対から始まる）
標的配列＃２（配列番号７６）：ＡＡＣ　ＣＴＡ　ＡＡＡ　ＴＡＧ　ＡＡＧ　ＡＣＣ　ＣＣＴ（コード配列の第６８０塩基対から始まる）
標的配列＃３（配列番号７７）：ＡＡＡ　ＡＧＡ　ＴＧＣ　ＴＧＡ　ＣＴＣ　ＡＧＡ　ＡＡＡ（コード配列の第７５２塩基対から始まる）
３種の配列はいずれもＲＮＰＳ１の発現を低減させるのに成功し、配列＃１はｍＲＮＡレベルを３５％低減させた。

【０１６７】
６．フューズドトウ（Ｆｕｓｅｄ　ｔｏｅｓ）（ＢＣ００１１３４）に対して、３種類のｓｉＲＮＡを作製した：
ＢＣ００１１３４（３２１２４７）
標的配列＃１（配列番号７８）：ＡＡＣ　ＣＴＡ　ＡＡＡ　ＴＡＧ　ＡＡＧ　ＡＣＣ　ＣＣＴ（コード配列の第６８０塩基対から始まる）
標的配列＃２（配列番号７９）：ＡＡＧ　ＡＣＣ　ＣＣＴ　ＡＴＧ　ＣＡＡ　ＴＴＡ　ＧＣＴ（コード配列の第６９２塩基対から始まる）
標的配列＃３（配列番号８０）：ＡＡＡ　ＡＡＧ　ＣＣＴ　ＧＡＡ　ＧＡＡ　ＣＡＧ　ＣＡＣ（コード配列の第７６９塩基対から始まる）
３種の配列はいずれもフューズドトウ（Ｆｕｓｅｄ　ｔｏｅｓ）の発現を低減させるのに成功し、配列＃２はｍＲＮＡレベルを４３％低減させた。

【０１６８】
７．グランカルシン（ＢＣ００５２１４）に対して３種類のｓｉＲＮＡを作製した：
ＢＣ００５２１４（３４１４０）
標的配列＃１（配列番号８１）：ＡＡＡ　ＴＧＧ　ＧＡＴ　ＴＴＡ　ＡＴＧ　ＣＡＴ　ＴＣＡ（コード配列の第３２３塩基対から始まる）
標的配列＃２（配列番号８２）：ＡＡＣ　ＴＴＣ　ＡＴＧ　ＡＣＴ　ＧＴＴ　ＧＡＴ　ＣＡＡ（コード配列の第３７９塩基対から始まる）
標的配列＃３（配列番号８３）：ＡＡＣ　ＡＴＣ　ＡＴＧ　ＡＧＴ　ＴＧＣ　ＧＴＣ　ＡＡＧ（コード配列の第４１９塩基対から始まる）
３種の配列はいずれもグランカルシンの発現を低減させるのに成功し、配列＃２はｍＲＮＡレベルを８３％低減させた。

【０１６９】
８．ＳＲＢ１／ＣＬＡ１／ＣＤ３６１１（ＢＣ０２２０８７）に対して３種類のｓｉＲＮＡを作製した：
ＢＣ０２２０８７（７５６６８７）
標的配列＃１（配列番号８４）：ＡＡＧ　ＣＡＧ　ＣＡＧ　ＧＴＣ　ＣＴＴ　ＡＡＧ　Ａ

ＡＣ（コード配列の第１０９塩基対から始まる）
標的配列＃２（配列番号８５）：ＡＡＴ　ＣＴＣ　ＡＴＣ　ＡＡＣ　ＡＡＧ　ＴＡＣ　ＴＴＴ（コード配列の第５６５塩基対から始まる）
標的配列＃３（配列番号８６）：ＡＡＴ　ＴＣＡ　ＧＡＡ　ＣＧＴ　ＣＡＧ　ＣＡＣ　ＣＴＧ（コード配列の第９８１塩基対から始まる）
標的配列＃１および＃３は、ＳＲＢ１の発現を低減させるのに成功し、配列＃１はｍＲＮＡレベルを６０％低減させた。
【０１７０】
９．ＫＩＡＡ００８２（ＢＣ０３１８９０）に対して３種類のｓｉＲＮＡを作製した：
ＢＣ０３１８９０（８２５２９３）
標的配列＃１（配列番号８７）：ＡＡＧ　ＡＧＧ　ＡＧＡ　ＡＣＴ　ＧＡＣ　ＣＣＡ　ＧＡＡ（コード配列の第４塩基対から始まる）
標的配列＃２（配列番号８８）：ＡＡＡ　ＴＧＡ　ＧＣＧ　ＡＴＴ　ＧＧＡ　ＴＧＧ　ＴＧＧ（コード配列の第５０９塩基対から始まる）
標的配列＃３（配列番号８９）：ＡＡＧ　ＡＴＣ　ＡＴＣ　ＡＡＧ　ＧＧＣ　ＴＣＣ　ＡＧＴ（コード配列の第２１６４塩基対から始まる）
配列＃１は、ｍＲＮＡレベルを６５％低減させた。配列＃２および＃３は、ｍＲＮＡレベルに対する効果を示さなかった。
【０１７１】
１０．ｅＩＦ２Ｂε（ＢＣ０１３５９０）に対して３種類のｓｉＲＮＡを作製した：
ＢＣ０１３５９０　（１６３０９９８）
標的配列＃１（配列番号９０）：ＡＡＴ　ＧＴＧ　ＧＴＴ　ＣＧＡ　ＡＴＡ　ＡＴＴ　ＡＣＡ（コード配列の第３５２塩基対から始まる）
標的配列＃２（配列番号９１）：ＡＡＡ　ＣＴＣ　ＧＡＧ　ＡＴＧ　ＡＣＴ　ＴＴＧ　ＴＧＣ（コード配列の第８００塩基対から始まる）
標的配列＃３（配列番号９２）：ＡＡＴ　ＣＡＡ　ＣＡＧ　ＣＴＧ　ＣＡＧ　ＡＧＧ　ＴＴＣ（コード配列の第２０９８塩基対から始まる）
配列＃１はｍＲＮＡレベルを５７％低減させ、配列＃２はｍＲＮＡレベルを５４％低減させ、配列＃３はｍＲＮＡレベルを４３％低減させた。
【０１７２】
１１．カルポニン２（Ｄ８３７３５）に対して３種類のｓｉＲＮＡを作製した：
Ｄ８３７３５（７１３８８６）
標的配列＃１（配列番号９３）：ＡＡＧ　ＧＡＴ　ＧＧＡ　ＡＣＴ　ＡＴＣ　ＴＴＡ　ＴＧＣ（コード配列の第１６３塩基対から始まる）
標的配列＃２（配列番号９４）：ＡＡＴ　ＴＴＣ　ＧＡＣ　ＧＡＴ　ＧＣＣ　ＡＣＣ　ＡＴＧ（コード配列の第４５７塩基対から始まる）
標的配列＃３（配列番号９５）：ＡＡＣ　ＣＧＡ　ＣＡＡ　ＧＴＧ　ＴＧＡ　ＣＡＡ　ＣＴＣ（コード配列の第７０８塩基対から始まる）
３種の配列はいずれも遺伝子発現のレベルを低減させ、配列＃３はｍＲＮＡレベルを７５％低減させた。
【０１７３】
１２．ＨＹＡ２２（Ｄ８８１５３）に対して３種類のｓｉＲＮＡを作製した：
Ｄ８８１５３（１２３９８０）
標的配列＃１（配列番号９６）：ＡＡＡ　ＧＡＡ　ＡＴＧ　ＴＧＴ　ＧＧＴ　ＣＡＴ　ＴＧＡ（コード配列の第５０７塩基対から始まる）
標的配列＃２（配列番号９７）：ＡＡＡ　ＴＣＧ　ＡＴＧ　ＧＡＡ　ＣＴＡ　ＴＡＣ　ＡＴＣ（コード配列の第５９６塩基対から始まる）
標的配列＃３（配列番号９８）：ＡＡＣ　ＴＡＴ　ＡＣＡ　ＴＣＡ　ＧＧＴ　ＧＴＡ　ＴＧＴ（コード配列の第６０６塩基対から始まる）
３種の配列はいずれも遺伝子発現のレベルを低減させ、配列＃３はｍＲＮＡレベルを６

０％低減させた。
【０１７４】
１３．ＣＡ１２５（ＢＣ００９８０８）に対して３種類のｓｉＲＮＡを作製した：
ＢＣ００９８０８（ＣＡ１２５）
標的配列＃１（配列番号９９）：ＡＡＴ　ＧＧＴ　ＴＴＣ　ＡＣＣ　ＣＡＴ　ＣＡＧ　ＡＧＣ（コード配列の第２３５塩基対から始まる）
標的配列＃２（配列番号１００）：ＡＡＧ　ＧＧＣ　ＴＣＡ　ＧＣＴ　ＡＣＡ　ＴＴＣ　ＡＡＣ（コード配列の第２２０３塩基対から始まる）
標的配列＃３（配列番号１０１）：ＡＡＴ　ＡＣＡ　ＡＣＧ　ＴＣＣ　ＡＧＣ　ＡＡＣ　ＡＧＴ（コード配列の第３３８０塩基対から始まる）
配列＃３は、ｍＲＮＡレベルを５０％低減させた。
【０１７５】
１４．ＨＭＴ１（ＡＦ２２２６８９）に対して２種類のｓｉＲＮＡを作製し、Ｈｅｙ細胞で試験した：
ＡＦ２２２６８９
標的配列＃１（配列番号１０２）：ＡＡＣ　ＴＣＣ　ＡＴＧ　ＴＴＴ　ＣＡＴ　ＡＡＡＣ　ＣＧＧ（コード配列の第２０２塩基対から始まる）
標的配列＃２（配列番号１０３）：ＡＡＣ　ＧＴＧ　ＴＡＴ　ＧＧＣ　ＴＴＣ　ＧＡＣ　ＡＴＧ（コード配列の第６１９塩基対から始まる）
いずれの配列もＨＭＴ１のｍＲＮＡ発現を低減させることに成功し、配列＃１は約７０％、配列＃２は６０％を少し超える程度低減させた。
【０１７６】
１５．ＭＰＰ１０（Ｘ９８４９４）に対して３種類のｓｉＲＮＡを作製し、Ｈｅｙ細胞で試験した：
Ｘ９８４９４
標的配列＃１（配列番号１０４）：ＡＡＧ　ＴＴＣ　ＣＡＧ　ＡＡＡ　ＴＣＴ　ＧＡＡ　ＡＴＡ（コード配列の第３５７塩基対から始まる）
標的配列＃２（配列番号１０５）：ＡＡＧ　ＡＡＡ　ＡＴＣ　ＣＡＧ　ＡＡＣ　ＡＴＧ　ＴＡＧ（コード配列の第１０４３塩基対から始まる）
標的配列＃３（配列番号１０６）：ＡＡＡ　ＡＣＡ　ＧＴＡ　ＧＣＴ　ＴＣＧ　ＧＡＧ　ＡＡＧ（コード配列の第１４１４塩基対から始まる）
３種の配列はいずれもｍＲＮＡ発現を低減させ、配列＃１はほぼ９０％の低減をもたらし、配列＃２および＃３は、それぞれ約３０％および４０％低減させた。
【０１７７】
１６．ＩＧＦＢＰ－７（ＢＣ０１７２０１）に対して２種類のｓｉＲＮＡを作製し、ＯＶＣＡ４２９で試験した。
ＢＣ０１７２０１
標的配列＃１：ＡＡＧ　ＧＴＡ　ＡＡＡ　ＡＧＧ　ＧＧＴ　ＣＡＣ　ＴＡＴ（コード配列の第５８３塩基対から始まる）（配列番号１０７）
標的配列＃２：ＡＡＡ　ＧＧＧ　ＧＴＣ　ＡＣＴ　ＡＴＧ　ＧＡＧ　ＴＴＣ（コード配列の第５９０塩基対から始まる）（配列番号１０８）
配列＃１のみが、ｍＲＮＡレベルの低減をもたらし、対照と比べて約６０％であった。
【０１７８】
１７．ＮＭ２３－Ｄ（ＢＣ００４８８０）に対して１種類のｓｉＲＮＡを作製し、ＯＶＣＡ４２９細胞で試験した：
ＢＣ００４８８０（２０３００３）
標的配列＃３：ＡＡＴ　ＧＴＣ　ＡＴＣ　ＣＡＣ　ＧＣＣ　ＡＧＣ　ＧＡＣ（最初のＡＴＧから４４２塩基対の位置で始まる）（配列番号１３５）
標的配列＃３のみが、対照と比べて約５０％ｍＲＮＡレベルを低減させた。
【０１７９】

１８．ＷＤＲ１（ＡＢ０１０４２７）に対して３種類のｓｉＲＮＡを作製し、ＯＶＣＡ４２９細胞で試験した：
ＡＢ０１０４２７
標的配列＃１：ＡＡＴ　ＧＧＡ　ＡＡＧ　ＴＧＣ　ＧＴＣ　ＡＴＣ　ＣＴＡ（最初のＡＴＧから１０６塩基対の位置で始まる）（配列番号１３６）
標的配列＃２：ＡＡＧ　ＴＴＣ　ＡＣＡ　ＡＴＴ　ＧＧＣ　ＧＡＣ　ＣＡＣ（最初のＡＴＧから５４４塩基対の位置で始まる）（配列番号１３７）
標的配列＃３：ＡＡＧ　ＴＧＣ　ＴＴＣ　ＡＧＣ　ＡＴＣ　ＧＡＣ　ＡＡＣ（最初のＡＴＧから１３０９塩基対の位置で始まる）（配列番号１３８）
標的配列はいずれもｍＲＮＡレベルを低減させ、対照と比べて、配列＃１は約８５％、配列＃２は約７５％、配列＃３は約７０％低減させた。
【０１８０】
１９．ビネキシンβ（ＡＦ０３７２６１）に対して１種類のｓｉＲＮＡを作製し、ＯＶＣＡ４２９細胞で試験した：
ＡＦ０３７２６１
標的配列＃２：ＡＡＧ　ＡＧＴ　ＴＡＣ　ＣＴＡ　ＧＡＡ　ＧＣＡ　ＣＣＴ（配列番号１３９）
標的配列＃１および＃３は対照と比べてｍＲＮＡレベルを低減させなかったのに対し、配列＃２はｍＲＮＡを対照と比べて約５０％低減させた。
【０１８１】
２０．ＫＬＫ６（ＢＣ０１５５２５）に対して３種類のｓｉＲＮＡを作製し、ＯＶＣＡ４２９細胞で試験した：
ＢＣ０１５５２５
標的配列＃１：ＡＡＡ　ＡＡＡ　ＣＣＧ　ＡＡＴ　ＣＴＴ　ＣＡＧ　ＧＴＣ（配列番号１４０）
標的配列＃２：ＡＡＡ　ＣＴＣ　ＴＣＴ　ＧＡＡ　ＣＴＣ　ＡＴＣ　ＣＡＧ（配列番号１４１）
標的配列＃３：ＡＡＣ　ＴＧＧ　ＡＴＣ　ＣＡＡ　ＡＡＡ　ＡＣＣ　ＡＴＴ（配列番号１４２）
標的配列＃１は対照と比べてｍＲＮＡレベルを低減させなかったのに対し、配列＃２は約４２％、配列＃３は約５５％、対照と比べてｍＲＮＡを低減させた。
【０１８２】
２１．ｅＩＦ５（Ｕ４９４３６）に対して１種類のｓｉＲＮＡを作製し、ＯＶＣＡ４２９細胞で試験した：
Ｕ４９４３６
標的配列＃１　ｍＲＮＡ標的配列：ＡＡＴ　ＧＡＣ　ＣＧＴ　ＴＡＣ　ＡＴＴ　ＧＴＣ　ＡＡＴ（配列番号１４３）
標的配列＃２および＃３は、対照と比べてｍＲＮＡレベルを低減させなかったのに対し、配列＃１は、対照と比べて約５９％、ｍＲＮＡを低減させた。
【０１８３】
２２．亜鉛フィンガータンパク質２６２／ＭＹＭ（ＡＢ００７８８５）に対して１種類のｓｉＲＮＡを作製し、ＯＶＣＡ４２９細胞で試験した：
ＡＢ００７８８５
標的配列＃３：ＡＡＡ　ＡＴＡ　ＴＧＧ　ＧＡＡ　ＣＣＴ　ＡＣＡ　ＡＴＡ（最初のＡＴＧから３０５８塩基対の位置で始まる）（配列番号１４４）
標的配列＃１および＃２は、対照と比べてｍＲＮＡレベルを低減させなかったのに対し、配列＃３は、対照と比べて約４５％、ｍＲＮＡを低減させた。
【実施例９】
【０１８４】
検証された遺伝子のｉｎ　ｖｉｔｒｏ機能試験

特異的なｓｉＲＮＡがＯＶＣＡ４２９細胞およびＯＶＣＡＲ－３細胞のシスプラチン感受性を高める能力を、ほぼ上記の実施例３～５で開示したようにして検査した。各事例において、シスプラチン感受性は、特異的ｓｉＲＮＡの存在下で増大したが、非特異的な（対照の）ｓｉＲＮＡ、または陰性対照（未処理）では増大しなかった。データは、試験した遺伝子が卵巣がん細胞株におけるシスプラチン抵抗性の発現に機能的に関与している可能性があることを示した。これらの結果を表４に要約する。

【０１８５】

【表４】

表4 in vitroシスプラチン感受性試験

登録番号	名称	siRNA 配列	OVCA429細胞での試験	429: シスプラチン感受性の増大	OVCAR-3細胞での試験	OVCAR-3: シスプラチン感受性の増大
M59818	G-CSFR	#1	yes	yes		
U31913	ARA9 XAP 2	#3	yes	yes	yes	yes
AF015608	RNPS1	#1	yes	yes		
BC001134	フューズドトウ	#2	yes	yes	yes	yes
BC005214	グランカルシン	#2	yes	yes	yes	yes
BC022087	SRB1	#1	yes	yes	yes	yes
BC031890	KIAA0082	#1	yes	yes	yes	yes
AB007885	亜鉛フィンガータンパク質	#3	yes	yes	yes	yes
BC004880	NM23D	#3	yes	yes	yes	yes
AB010427	WDR1	#1		no	yes	yes
U49436	eIF5 eIF5A	#1	yes	yes	yes	yes
D83735	カルポニン2	#3	yes	yes	Yes	yes
BC015525	KLK6	#3	yes	yes	yes	yes
AF037261	ビネキシンβ	#2		no	yes	yes
BC017201	IGFBP-7	#1	yes	yes	yes	yes
D88153	HYA22	#3	yes	境界	yes	yes
BC013590	eIF2Bε	#1	yes	yes	yes	yes
L36870	SAPK/Erk1	#2	yes	yes	yes	yes

【実施例１０】

【０１８６】

ｉｎ　ｖｉｖｏ実験：

ＯＶＣＡＲ－３細胞およびヌードマウスを用いて腫瘍の増殖を検査するために、以下のプロトコールを作成した：ＯＶＣＡＲ－３細胞（１５００万個／注射）をヌードマウスの上腕部分に接種した。２５日後に目に見える腫れ物が現れた。接種後約３５日目に腫瘍は測定可能な大きさとなった。次に、動物を、１週３回２週間の腹腔内注射投与により４μｇ／ｋｇ（体重）のシスプラチンで治療し、その後１週間は治療をしないもの、あるいは、対照として生理食塩水のみで処置するもののいずれかとした。図６３は、マウス２匹の体重の関数として腫瘍体積を示すグラフである。このデータは、腫瘍を有する対照の動物が、化学療法がまったくなされない場合は腫瘍を増殖し続けることを実証した（マウス＃１）。一方、シスプラチン治療を受けた動物は、腫瘍サイズの安定化を示した（マウス＃

２）。シスプラチン治療前後の腫瘍の写真も示す。

【０１８７】

このプロトコールを、本明細書で特定した遺伝子（ＭｅｔＡＰ－２、ＳＰＡＲＣ、Ｓ１００Ａ１０、Ｓ１００Ａ１１、およびカルパイン２）に対するｓｉＲＮＡを発現する安定な細胞株を用いて繰り返す。カルパイン２またはＳ１００Ａ１１のｓｉＲＮＡを発現している安定なＯＶＣＡＲ－３細胞株、ならびに緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ、細胞増殖に関連しないマーカータンパク質）に対する安定なｓｉＲＮＡを発現している対照のＯＶＣＡＲ－３細胞株を作製した；定量的リアルタイムＰＣＲによって測定した、カルパイン２およびＳ１００Ａ１１の発現ならびにｓｉＲＮＡ発現の効果を図６４に示す。１５匹のマウスを５匹ずつの３群に分ける。１つの群を対照として扱い、ｓｉＲＮＡを発現していないＯＶＣＡＲ－３細胞を注射する。第２群にはｓｉＲＮＡを発現しているＯＶＣＡＲ－３細胞を注射し、第３群にはＧＦＰ特異的ｓｉＲＮＡを発現しているＯＶＣＡＲ－３細胞を注射する。測定可能な腫瘍が認められるようになった後、対照群には生理食塩水を注射し、第２群および第３群には標準のシスプラチン治療を施す。前述したように、体重の関数として腫瘍の増殖を観察する。

【０１８８】

別の実験では、１５匹のマウスを５匹ずつの群に分け、純粋な（すなわち、組換え体ではない）ＯＶＣＡＲ－３細胞を接種し、腫瘍を増殖させた。１つの群は対照として扱う。測定可能な腫瘍が認められるようになった後、対照群には生理食塩水を注射し、第２群には前述したように標準のシスプラチン治療を施し、第３群にはＴＮＰ－４７０（臨床的に認められているフマギリン誘導体）を併用する標準のシスプラチン治療を施す。前述したように、体重の関数として腫瘍の増殖を観察する。

【０１８９】

実施例で開示した情報は以下のように要約することができる。

【０１９０】

【表５】

表5

登録番号	名称	卵巣がん患者の組織試料パネルでの試験	OVCA429、OVCAR-3（もしくは両方）またはHeyにおけるin vitroの機能検証に合格*
BC015973	S100A10 p11 CLP11 カルパクチン1 軽鎖 42C	yes	yes
BC001410	S100A11 S100C カルギザリン	yes	yes
AF261089	カルパイン2 CANPL2 MCANP	yes	yes
BC004974	SPARC オステオネクチン BM-40	yes	yes

登録番号	名称	卵巣がん患者の組織試料パネルでの試験	OVCA429、OVCAR-3（もしくは両方）またはHeyにおけるin vitroの機能検証に合格*
BC013782	MetAP2 p67eIF2 MNPEP	yes	yes
BC015525	KLK6 ザイム ニューロシン プロテアーゼM	yes	yes
AF222689	HMT1 HMT2 ANM1 HCP1	yes	no
U31913	ARA9 XAP2	no	yes
D83735	カルポニン2	no	yes
U19251	NAIP	yes	no
BC005291	eEF1ε p18	yes	no
AF015608	RNPS1	yes	yes
U49436	eIF5 eIF5A	yes	yes
BC013590	eIF2Bε	yes	yes
M65217	HSF2 HSTF2	no	no
AB010427	WDR1 NORI-1	yes	yes
BC001134	フューズドトウ	no	yes
BC004880	NM23D mn23-H4	yes	yes
U10439	ADAR1	yes	no
BC005214	グランカルシン	no	yes
BC009808	NBR1	no	no
L36870	SAPK/Erk1 JNKK1 MEK4	yes	yes

登録番号	名称	卵巣がん患者の組織試料パネルでの試験	OVCA429、OVCAR-3（もしくは両方）またはHeyにおけるin vitroの機能検証に合格*
	MKK4 MAPKK4		
AB007885	亜鉛フィンガータンパク質－262 MYM	yes	yes
D88153	HYA22	yes	yes
AB049635	MRPL4 CGI-28	yes	no
AF037261	ビネキシンβ	yes	yes
M59818	G-CSFR	yes	yes
BC015710	RAB22A	yes	no
BC017201	IGFBP-7 MAC25 FSTL2	no	yes
BC011770	FASTキナーゼ	no	no
AB057597	TESK2	no	no
BC022087	SRB1 CLA1 CD36L1	yes	yes
BC031890	KIAA0082	no	yes
NM_006312	NCOR2	no	no
BC032338	MT1	yes	no
X98494	MPP10	no	no

*: 薬剤抵抗性の腫瘍細胞において発現が上昇するすべての遺伝子（KLK6、ARA9、カルポニン2、RNPS1、eIF5、eIF2Bε、WDR1、フューズドトウ、NM23D、グランカルシン、SAPK／Erk1、亜鉛フィンガータンパク質－262MYM、HYA22、ビネキシンβ、G-CSFR、IGFBP-7、SRB1、またはKIAA0082）をOVCAR-3細胞またはOVCA429細胞で試験し、ほとんどの抵抗性の腫瘍細胞において発現が低下するすべての遺伝子（MPP10、HMT1、NAIP、Eef1ε、RAB22A、NCOR2、またはMT1）をHey細胞で試験した。

以上の開示内容は本発明の一部の特定の実施形態を強調するものであり、該実施形態に等価な全ての修正形態または代替形態は添付の特許請求の範囲に記載の本発明の趣旨および範囲に含まれると理解されるべきである。

【図面の簡単な説明】

【０１９１】

【図１】化学療法薬に対する抵抗性が高い卵巣がん細胞株においてＳ１００Ａ１０が高いレベルで発現されていることを実証する、ノーザンブロット解析の結果を示すオートラジオグラム写真およびノーザンブロットの結果のグラフ図。

【図２】化学療法薬に対する抵抗性が高い卵巣がん細胞株においてＳ１００Ａ１１が高いレベルで発現されていることを実証する、ノーザンブロット解析の結果を示すオートラジオグラム写真およびノーザンブロットの結果のグラフ図。

【図３】化学療法に対する反応性がより高い患者から得た試料と比べて、抵抗性がより高い患者の腫瘍試料においてＳ１００Ａ１０およびＳ１００Ａ１１のｍＲＮＡレベルが上昇していることを実証する、ノーザンブロット解析の結果を示すオートラジオグラム写真およびノーザンブロットの結果のグラフ図。
【図４】化学療法抵抗性の細胞株でＳＰＡＲＣが高いレベルで発現していたことを実証する、定量的リアルタイムＰＣＲの結果を示すグラフ。
【図５】がんが再発していた患者から採取した試料においてＳＰＡＲＣのｍＲＮＡが増大していたことを実証する、ノーザンブロット解析の結果を示すオートラジオグラム写真。
【図６】化学療法抵抗性の卵巣がん細胞株でカルパイン２のｍＲＮＡレベルが上昇していたことを実証する、ノーザンブロット解析の結果を示すオートラジオグラム写真およびノーザンブロットの結果のグラフ図。
【図７】シスプラチンを用いた治療に対して感受性の細胞株と比べて、化学療法抵抗性の細胞株においてグランカルシンのｍＲＮＡレベルが上昇していたことを実証するノーザンブロットの結果のグラフ図。
【図８】ＭｅｔＡＰ２タンパク質の発現が化学療法抵抗性の極めて高い細胞株ＯＶＣＡ４２９において上昇しており、シスプラチン治療に対して感受性であるＨｅｙ細胞株において下方制御されていたことを実証する、ウェスタンブロット解析の結果を示すオートラジオグラム写真およびウェスタンブロットの結果のグラフ図。
【図９】シスプラチン系の化学療法に対する抵抗性のレベルが異なる３名の患者から得た組織試料におけるＭｅｔＡＰ２のｍＲＮＡ発現を示す、ノーザンブロット解析の結果を示すオートラジオグラム写真およびノーザンブロットの結果のグラフ図。ＭｅｔＡＰ２は、化学療法に対する抵抗性が中間レベルの患者（ＣＡＰ２）および低レベルの患者（ＣＡＰ１）と比較して、最も抵抗性の高い腫瘍を有する患者（ＣＡＰ３）から得た試料において最も増大している。
【図１０】シスプラチンに対する抵抗性のレベルが最も高い卵巣がん細胞株においてｅＩＦ５の２種の転写物が検出され、いずれの発現レベルも上昇していたことを実証する、ノーザンブロット解析の結果を示すオートラジオグラム写真およびノーザンブロットの結果のグラフ図。
【図１１】腫瘍の再発前（ＣＡＰ２）および再発後（ＣＡＰ２＋）の化学療法抵抗性の患者の腫瘍試料におけるｅＩＦ５の発現を示す、ノーザンブロット解析の結果を示すオートラジオグラム写真およびノーザンブロットの結果のグラフ図。
【図１２】化学療法抵抗性の細胞株でｅＩＦ２Ｂεのｍ ＲＮＡが増大していたことを実証する、ノーザンブロット解析の結果を示すオートラジオグラム写真およびノーザンブロットの結果のグラフ図。
【図１３】シスプラチンに対する抵抗性が最も高い卵巣がん細胞株においてｅＥＦ１εのｍＲＮＡが下方制御されていたことを実証する、ノーザンブロット解析の結果を示すオートラジオグラム写真およびノーザンブロットの結果のグラフ図。
【図１４】シスプラチンに感受性の細胞株と比べて、抵抗性の細胞株においてＳＡＰＫ／Ｅｒｋ１のｍＲＮＡレベルが上昇していたこと実証する、ノーザンブロットの結果のグラフ図。
【図１５】ＴＥＳＫ２のｍＲＮＡがシスプラチン抵抗性の細胞株において増大していたことを実証する、ノーザンブロットの結果のグラフ図。
【図１６】ＦＡＳＴキナーゼｍＲＮＡがシスプラチン抵抗性の細胞株において増大していたことを実証する、ノーザンブロットの結果のグラフ図。
【図１７】試験されたシスプラチン抵抗性の細胞株においてＫＬＫ６の発現レベルが増大されていたことを実証する、ノーザンブロット解析の結果を示すオートラジオグラム写真およびノーザンブロットの結果のグラフ図。
【図１８】シスプラチン抵抗性の細胞においてＨＭＴ１の発現が下方制御されていたことを実証する、ノーザンブロット解析の結果を示すオートラジオグラム写真およびノーザンブロットの結果のグラフ図。

【図１９】シスプラチン抵抗性の細胞においてＡＲＡ９由来のｍＲＮＡが増大していたことを実証する、ノーザンブロット解析の結果を示すオートラジオグラム写真およびノーザンブロットの結果のグラフ図。
【図２０】化学療法感受性の卵巣がん細胞株と比較して化学療法抵抗性の細胞株でカルポニン２の発現が増大していたことを実証する、ノーザンブロット解析の結果を示すオートラジオグラム写真およびノーザンブロットの結果のグラフ図。
【図２１】シスプラチンに最も抵抗性の高い細胞株において、神経細胞アポトーシス阻害タンパク質の遺伝子発現が低下していたことを実証する、ノーザンブロット解析の結果を示すオートラジオグラム写真およびノーザンブロットの結果のグラフ図。
【図２２】シスプラチン抵抗性の細胞株においてＲＮＰＳ１のレベルが増大していたことを実証する、ノーザンブロット解析の結果を示すオートラジオグラム写真およびノーザンブロットの結果のグラフ図。
【図２３】化学療法抵抗性の細胞株でＨＳＦ２のｍＲＮＡのレベルが上昇していたことを実証する、ノーザンブロット解析の結果を示すオートラジオグラム写真およびノーザンブロットの結果のグラフ図。
【図２４】化学療法感受性の細胞株と比較して化学療法抵抗性の細胞株でＷＤＲ１のｍＲＮＡが増大していたことを実証する、ノーザンブロット解析の結果を示すオートラジオグラム写真およびノーザンブロットの結果のグラフ図。
【図２５】シスプラチン抵抗性の細胞株においてＦｔ１のｍＲＮＡレベルが上昇していたことを実証する、ノーザンブロット解析の結果を示すオートラジオグラム写真およびノーザンブロットの結果のグラフ図。
【図２６】化学療法抵抗性の細胞株でＮＭＥ４のｍＲＮＡが増大していたことを実証する、ノーザンブロット解析の結果を示すオートラジオグラム写真およびノーザンブロットの結果のグラフ図。
【図２７】シスプラチン抵抗性の細胞株においてＡＤＡＲ１のｍＲＮＡが増大していたことを実証する、ノーザンブロットの結果のグラフ図。
【図２８】ＮＢＲ１のｍＲＮＡが、試験された他の細胞株と比較して最も化学療法抵抗性が高い細胞株であるＯＶＣＡ４２９において増大していたことを実証する、ノーザンブロットの結果のグラフ図。
【図２９】亜鉛フィンガータンパク質２６２に対するｍＲＮＡが、試験された他の細胞株と比較して最もシスプラチン抵抗性が高い細胞株おいて増大していたことを実証する、ノーザンブロットの結果のグラフ図。
【図３０】ＭＲＰＬ４のｍＲＮＡが、化学療法抵抗性の細胞株において増大していたことを実証する、ノーザンブロットの結果のグラフ図。
【図３１】ＨＹＡ２２のｍＲＮＡが、化学療法感受性の細胞株と比較して化学療法抵抗性の細胞株において増大していたことを実証する、ノーザンブロットの結果のグラフ図。
【図３２】ビネキシンβのｍＲＮＡが、化学療法抵抗性の細胞株において増大していたことを実証する、ノーザンブロットの結果のグラフ図。
【図３３】Ｇ－ＣＳＦＲのｍＲＮＡが、化学療法抵抗性の細胞株において増大していたことを実証する、ノーザンブロットの結果のグラフ図。
【図３４】ＳＲＢ１のｍＲＮＡが、化学療法抵抗性の細胞株において増大していたことを実証する、ノーザンブロットの結果のグラフ図。
【図３５】ＩＧＦＢＰ－７のｍＲＮＡが、化学療法抵抗性の細胞株において増大していたことを実証する、ノーザンブロットの結果のグラフ図。
【図３６】ＲＡＢ２２ＡのｍＲＮＡが、化学療法抵抗性の細胞株において低下していたこと、および反応性のより高い細胞株において増大していることを実証する、ノーザンブロットの結果のグラフ図。
【図３７】ＫＩＡＡ００８２のｍＲＮＡの発現が、化学療法抵抗性の細胞株において増大していたことを実証する、ノーザンブロットの結果のグラフ図。
【図３８】ＮＣＯＲ２のｍＲＮＡが、シスプラチン感受性の細胞株と比較して抵抗性の細

胞株において低減していたことを実証する、ノーザンブロット解析および結果のグラフ図。
【図３９】ＭＴＴアッセイの結果に基づく、シスプラチンに対する感受性のレベルによる５種の卵巣がん細胞株の順位付けを示す図。
【図４０】（上側パネル）：フマギリンの濃度上昇がフマギリンへの曝露４時間後のＯＶＣＡ４２９細胞生存率に与える効果を示すグラフ。（下側パネル）：０．１μｇ／ｍｌのフマギリンの存在下ではシスプラチンの効果が増大されたが、１０μｇ／ｍｌのフマギリンの存在下で４時間、シスプラチンで細胞を処理したときは効果が増大されなかったことを示すグラフ。
【図４１】（上側パネル）：フマギリンの濃度上昇がフマギリンへの曝露８時間後のＯＶＣＡ４２９細胞生存率に与える効果を示すグラフ。（下側パネル）：０．１μｇ／ｍｌのフマギリンの存在下ではシスプラチンの効果が増大されたが、１０μｇ／ｍｌのフマギリンの存在下で８時間、シスプラチンで細胞を処理したときは効果が増大されなかったことを示すグラフ。
【図４２】（上側パネル）：フマギリンの濃度上昇がフマギリンへの曝露２４時間後のＯＶＣＡ４２９細胞生存率に与える効果を示すグラフ。（下側パネル）：０．１μｇ／ｍｌのフマギリンの存在下ではシスプラチンの細胞毒性効果が増大されたが、１０μｇ／ｍｌのフマギリンの存在下で２４時間、シスプラチンで細胞を処理したときは効果が増大されなかったことを示すグラフ。
【図４３】ＭｅｔＡＰ－２メッセンジャーＲＮＡの異なる領域を標的とするように設計された、３種のｓｉＲＮＡ（＃１：配列番号４、＃２：配列番号５、＃３：配列番号６）の概略図。
【図４４】定量的リアルタイムＰＣＲにより決定した、ＯＶＣＡ４２９におけるＭｅｔＡＰ－２発現レベルに対するｓｉＲＮＡ＃１の効果を示すグラフ。
【図４５】ｓｉＲＮＡ＃１の存在下でＯＶＣＡ４２９をシスプラチンに曝露させた後にＭＴＴアッセイにより決定した、細胞生存率の定量結果を示すグラフ。
【図４６】ＭｅｔＡＰ－２のｓｉＲＮＡ＃１でトランスフェクションしたＯＶＣＡ４２９細胞に対するシスプラチンの効果を示すＭＴＴアッセイ（図４５に示す定量アッセイ）を実施した後の、ＯＶＣＡ４２９細胞の入った９６ウェルプレートの写真。
【図４７】ＳＰＡＲＣのメッセージの異なる領域を標的とするように設計された、３種のｓｉＲＮＡ（＃１：配列番号１、＃２：配列番号２、＃３：配列番号３）の概略図。
【図４８】図４７に示すｓｉＲＮＡでトランスフェクションしたＯＶＣＡ４２９細胞におけるＳＰＡＲＣ発現の定量的リアルタイムＰＣＲ解析の結果を示すグラフ。
【図４９】ＳＰＡＲＣのｓｉＲＮＡ＃２の存在下でのＯＶＣＡ４２９細胞に対するシスプラチンの効果を測定するためにＭＴＴアッセイを実施した後の、ＯＶＣＡ４２９細胞の入った９６ウェルプレートの写真。
【図５０】ｓｉＲＮＡを介したＳＰＡＲＣ遺伝子発現の低減がＯＶＣＡ４２９細胞のシスプラチン感受性に与える効果を示すグラフ。
【図５１】ＭＴ１のｍＲＮＡが、シスプラチンに対する感受性が最も高い細胞株（Ｈｅｙ）において著しく増大していたことを実証する、ノーザンブロットの結果のグラフ図。
【図５２】シスプラチンに対する感受性が高くなるほど、ＭＰＰ１０のｍＲＮＡが増大していたことを実証する、ノーザンブロットの結果のグラフ図。
【図５３】ＯＶＣＡ４２９細胞におけるカルパイン２遺伝子発現のｓｉＲＮＡを介した低減の効果を示すグラフ。
【図５４】ＯＶＣＡ４２９細胞のシスプラチン感受性に対するカルパイン２のｓｉＲＮＡ＃３の効果を示すグラフ。
【図５５】ＯＶＣＡ４２９細胞のシスプラチン感受性に対するカルパイン２阻害因子ＡＬＬＮの効果を示すグラフ。
【図５６】ＯＶＣＡ４２９細胞のシスプラチン感受性に対するＳＡ１００Ａ１０遺伝子発現のｓｉＲＮＡを介した低減の効果を示すグラフ。

【図５７】ＯＶＣＡ４２９細胞におけるＳ１００Ａ１１遺伝子のｍＲＮＡ発現レベルに対するｓｉＲＮＡの効果を示すグラフ。
【図５８】正常細胞および結腸がん細胞のｃＤＮＡにおけるＭｅｔＡｐ－２のｍＲＮＡ発現レベルを示すグラフ。
【図５９】正常細胞および結腸がん細胞のｃＤＮＡにおけるＳＰＡＲＣのｍＲＮＡ発現レベルを示すグラフ。
【図６０】正常細胞および結腸がん細胞のｃＤＮＡにおけるＳ１００Ａ１１のｍＲＮＡ発現レベルを示すグラフ。
【図６１】正常細胞および結腸がん細胞のｃＤＮＡにおけるＳ１００Ａ１０のｍＲＮＡ発現レベルを示すグラフ。
【図６２】正常細胞および結腸がん細胞のｃＤＮＡにおけるカルパイン－２のｍＲＮＡ発現レベルを示すグラフ。
【図６３】ＯＶＣＡＲ－３細胞（１５００万個／注射、アメリカンタイプカルチャーコレクション（Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ［米国バージニア州マナッサス（Ｍａｎａｓｓａｓ）所在］から入手、登録番号ＨＴＢ－１６１）を注射し、３５日後に、４μｇ／ｋｇ（体重）のシスプラチンを週に３回ずつ２週間、腹腔内投与して治療し、その後は１週間治療を行わなかったヌードマウス、または対照として生理食塩水溶液のみで処理したヌードマウス２匹の体重の関数として腫瘍の体積を示すグラフ。
【図６４】ＯＶＣＡＲ－３細胞におけるカルパイン２またはＳ１００Ａ１１に対するｓｉＲＮＡの安定な発現を示すグラフ。対照では、双方のｍＲＮＡの発現を、未処理の細胞または無関係なＧＦＰ　ｓｉＲＮＡを含む細胞において測定した。カルパイン２およびＳ１００Ａ１１のｍＲＮＡ発現は、関連性のあるｓｉＲＮＡの場合に大きく低減された。

【図１】

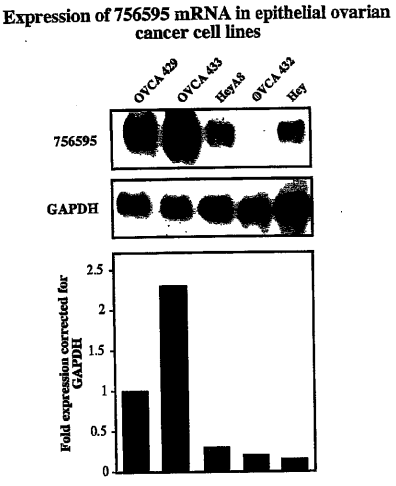

Figure 1

【図２】

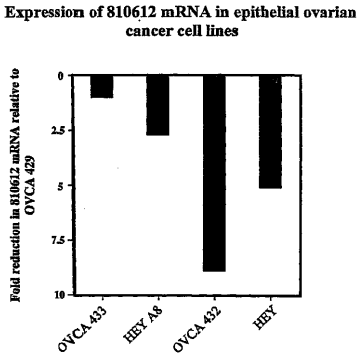

Figure 2

【図３】

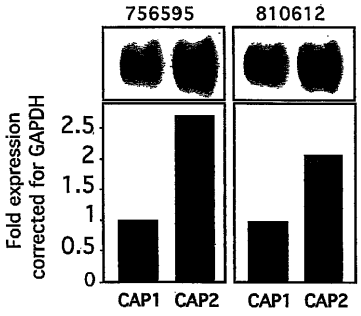

Figure 3

【図４】

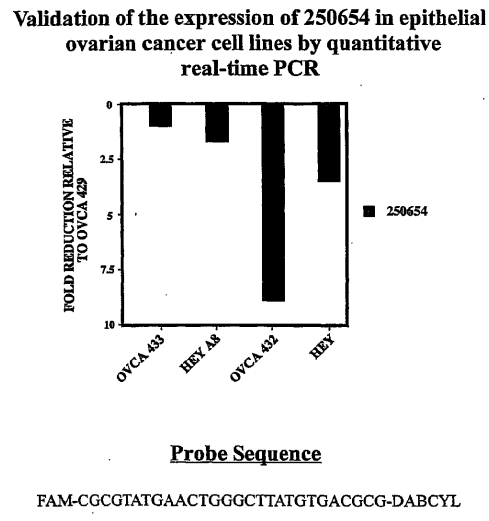

Figure 4

【図５】

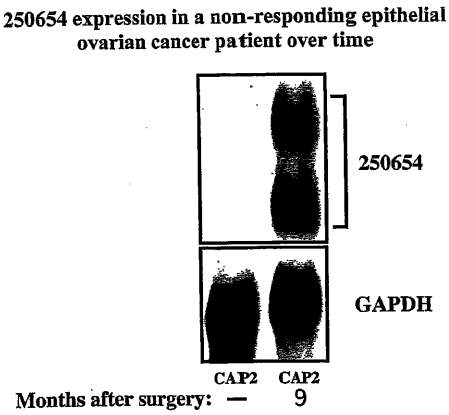

Figure 5

【図６】

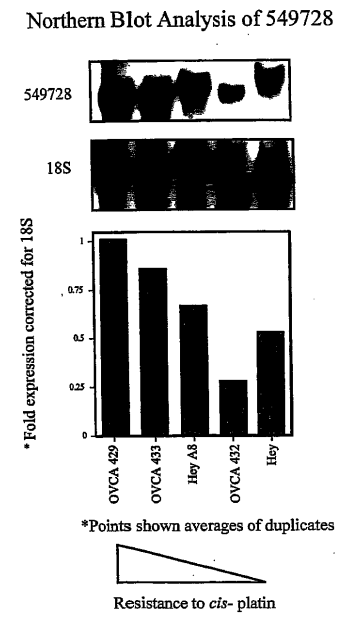

Figure 6

【図７】

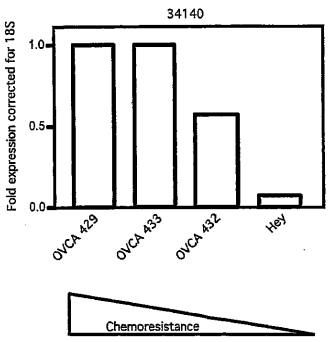

Figure 7

【図８】

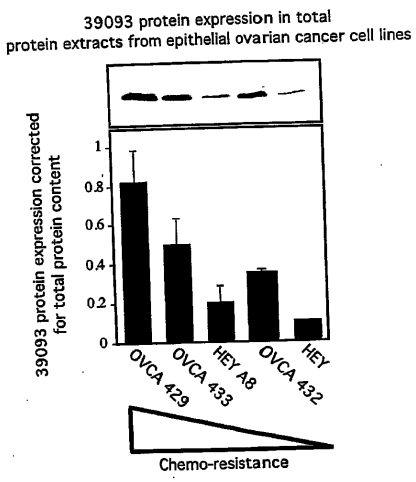

Figure 8

【図９】

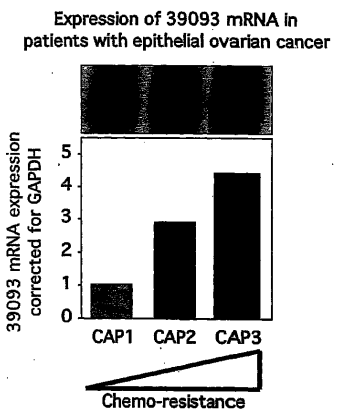

Figure 9

【図１０】

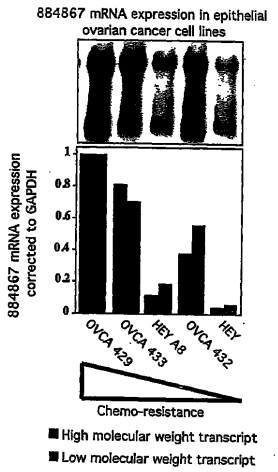

Figure 10

【図１１】

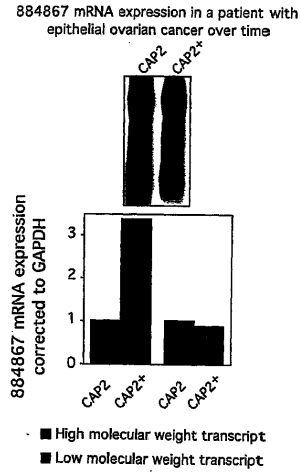

Figure 11

【図１２】

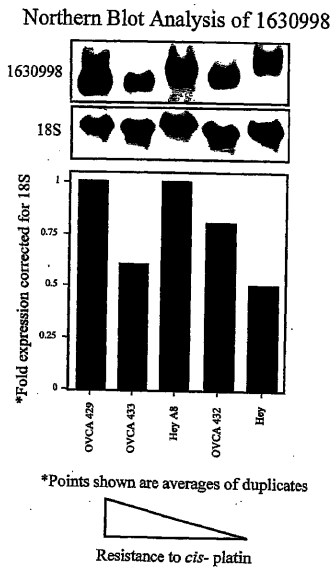

Figure 12

【図１３】

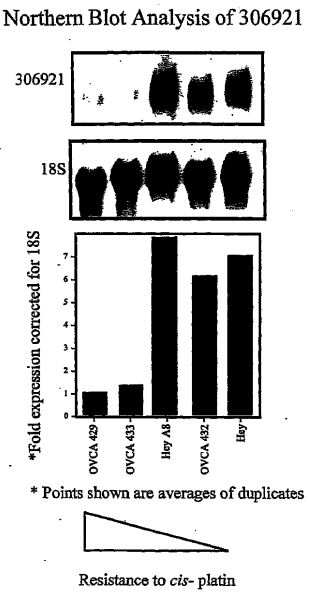

Figure 13

【図１４】

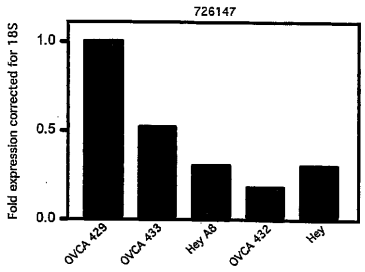

Figure 14

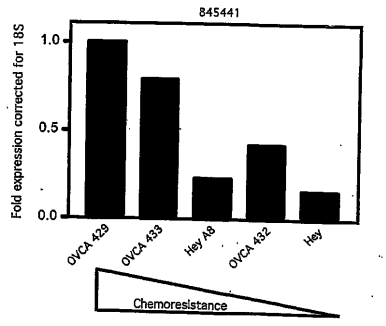

Figure 15

【図１５】

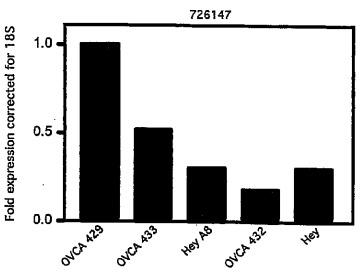

Figure 14

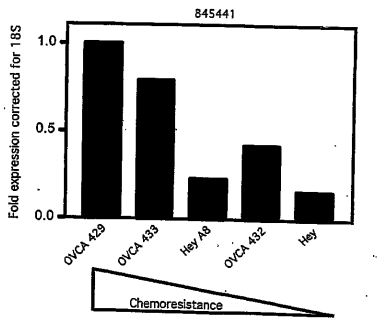

Figure 15

【図１６】

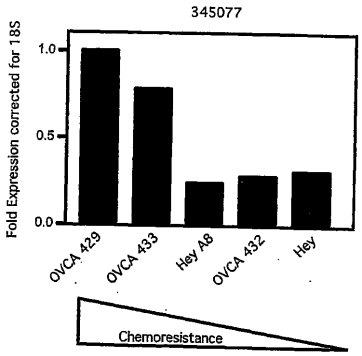

Figure 16

【図１７】

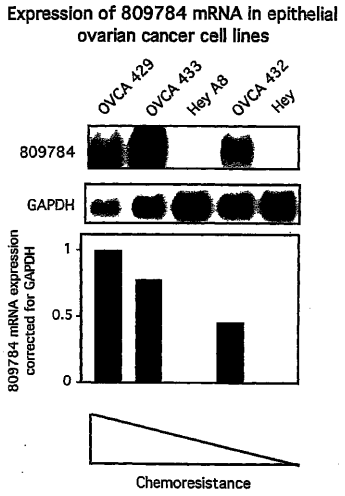

Figure 17

【図１８】

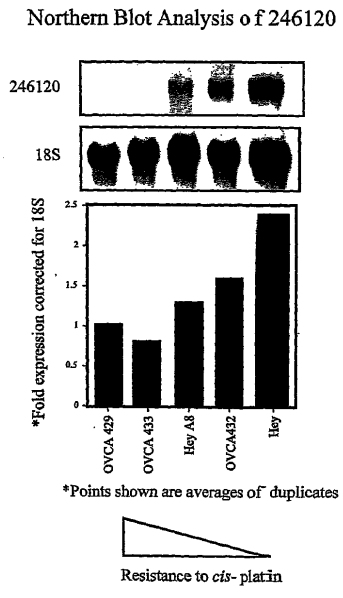

Figure 18

【図１９】

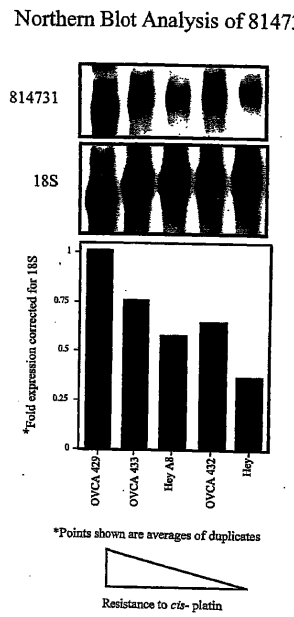

Figure 19

【図２０】

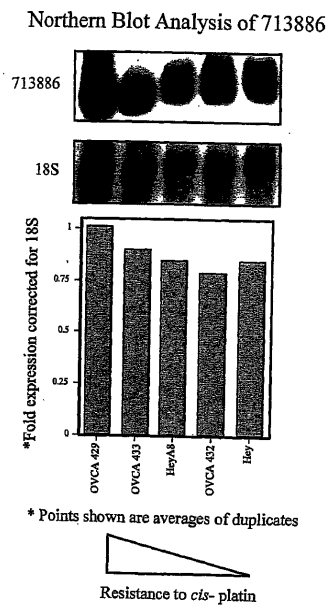

Figure 20

【図２１】

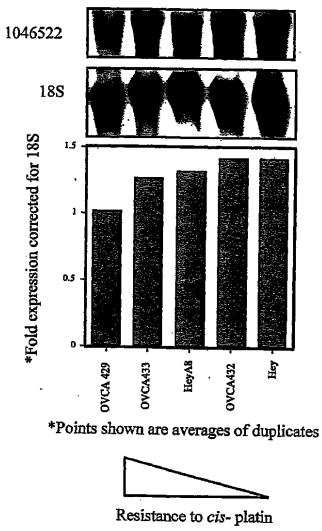

Figure 21

【図２２】

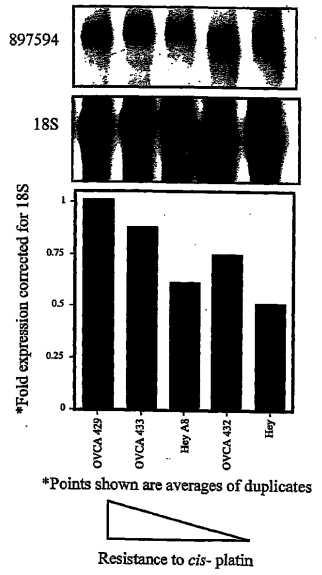

Figure 22

【図２３】

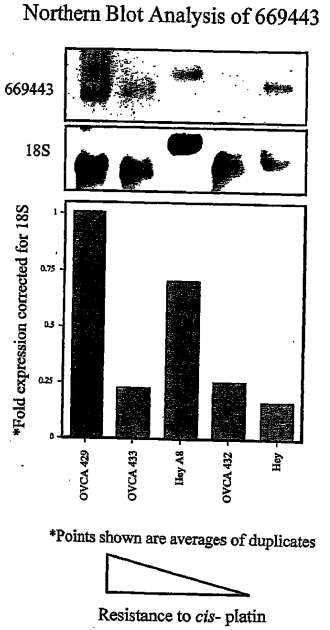

Figure 23

【図２４】

Northern Blot Analysis of 714196

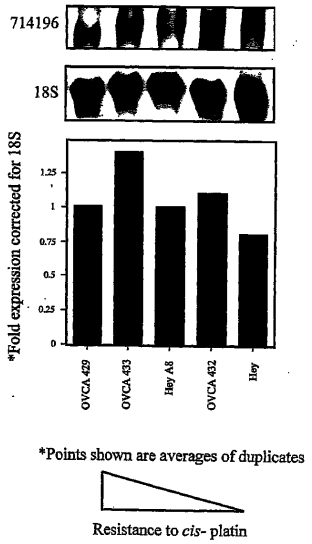

Figure 24

【図２５】

Northern Blot Analysis of 321247

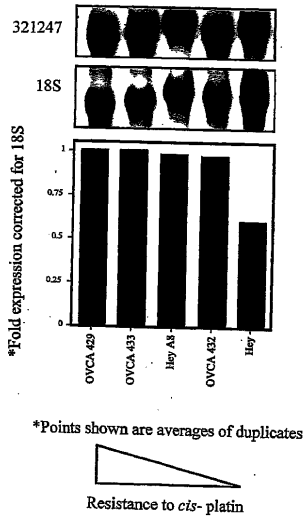

Figure 25

【図２６】

Northern Blot Analysis of 203003

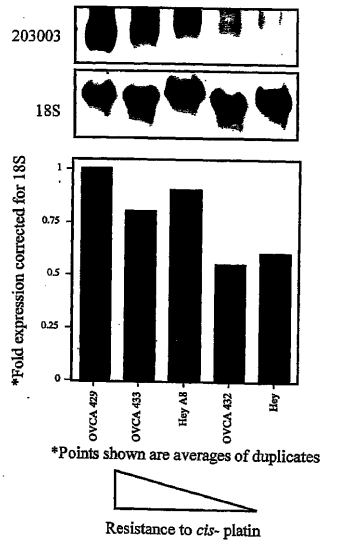

Figure 26

【図２７】

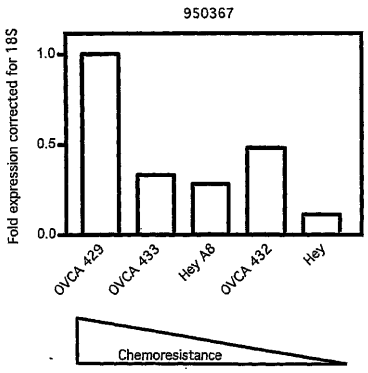

Figure 27

【図２８】

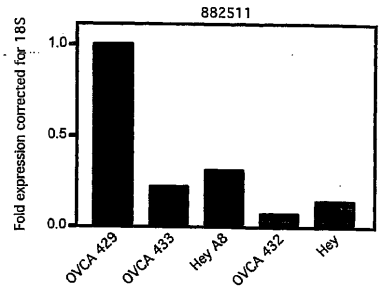

Figure 28

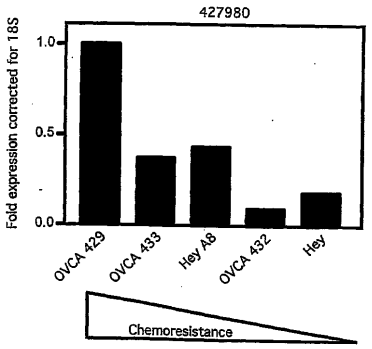

Figure 29

【図２９】

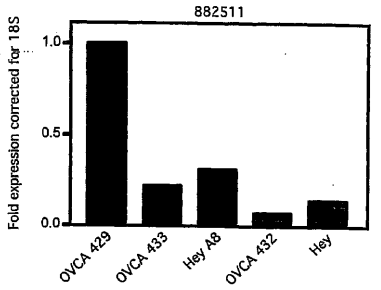

Figure 28

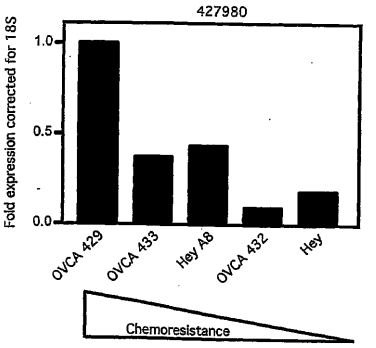

Figure 29

【図３０】

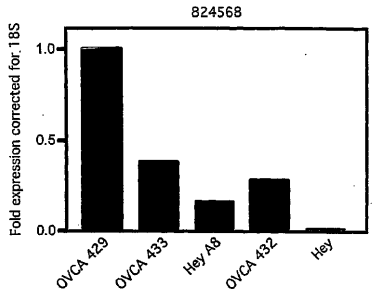

Figure 30

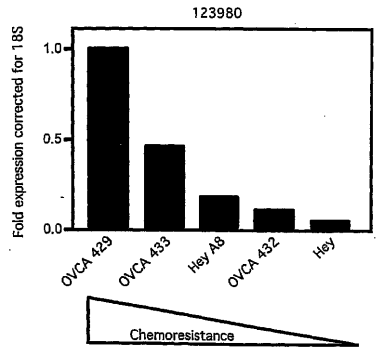

Figure 31

【図３１】

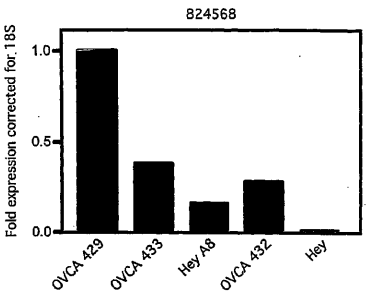

Figure 30

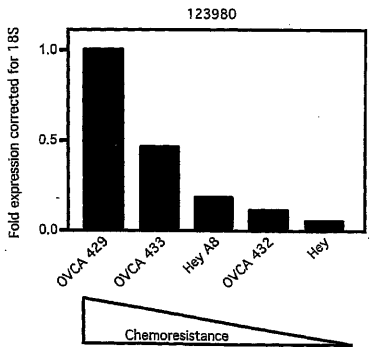

Figure 31

【図３２】

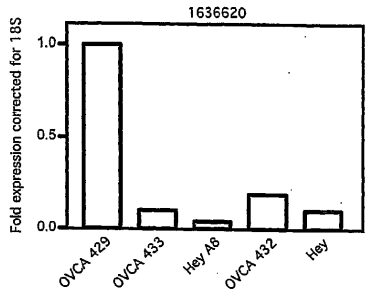

Figure 32

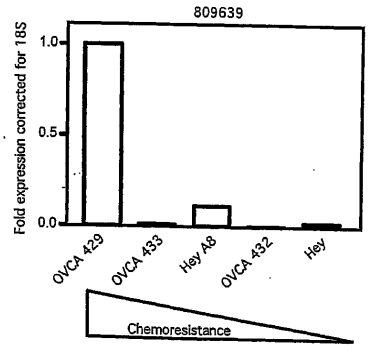

Figure 33

【図３３】

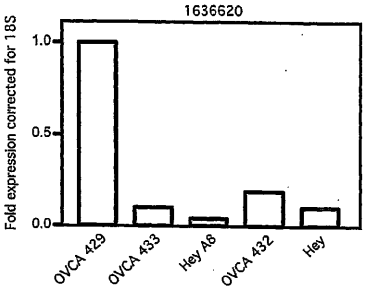

Figure 32

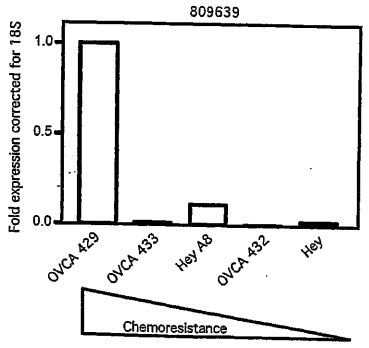

Figure 33

【図３４】

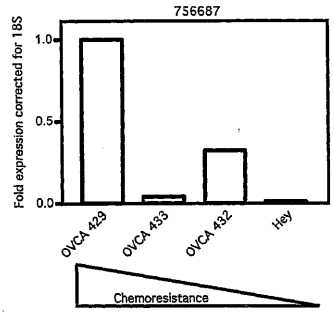

Figure 34

【図３５】

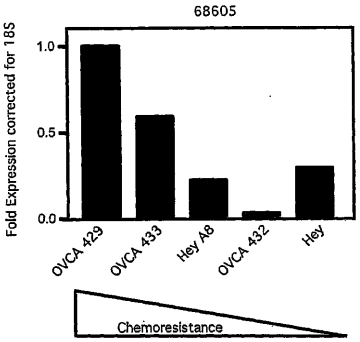

Figure 35

【図３６】

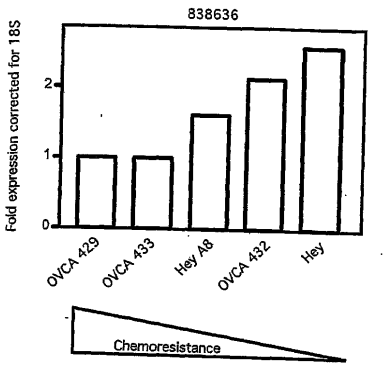

Figure 36

【図３７】

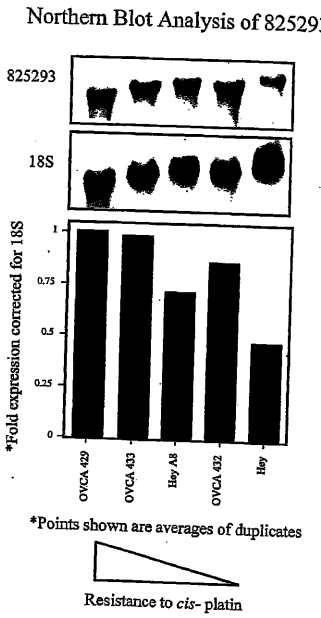

Figure 37

【図３８】

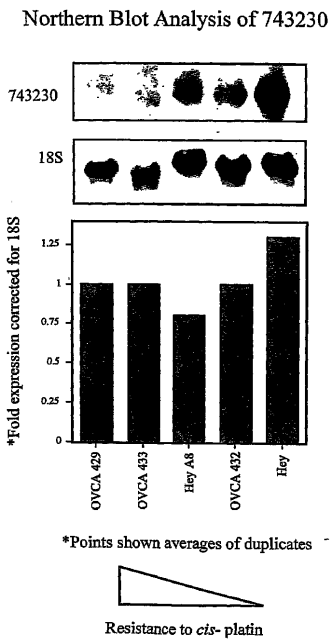

Figure 38

【図３９】

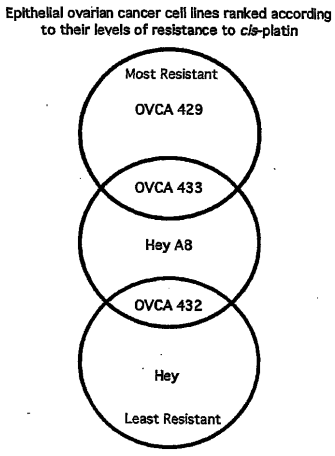

Figure 39

【図４０】

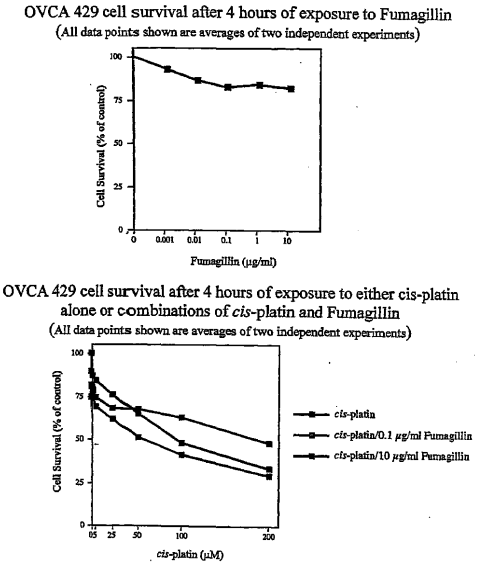

Figure 40

【図４１】

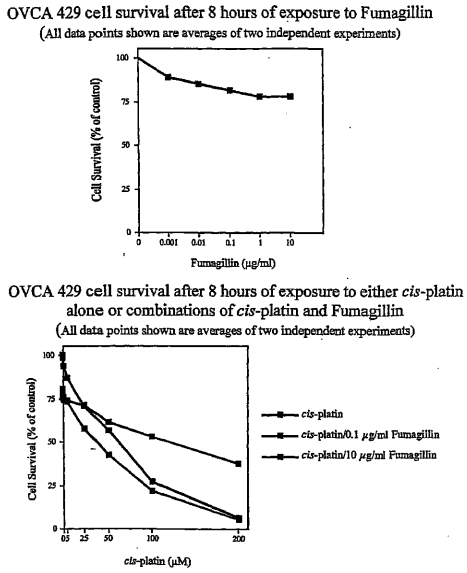
OVCA 429 cell survival after 8 hours of exposure to Fumagillin
(All data points shown are averages of two independent experiments)
Cell Survival (% of control)
Fumagillin (μg/ml)
OVCA 429 cell survival after 8 hours of exposure to either cis-platin alone or combinations of cis-platin and Fumagillin
(All data points shown are averages of two independent experiments)
Cell Survival (% of control)
cis-platin (μM)
cis-platin
cis-platin/0.1 μg/ml Fumagillin
cis-platin/10 μg/ml Fumagillin

Figure 41

【図４２】

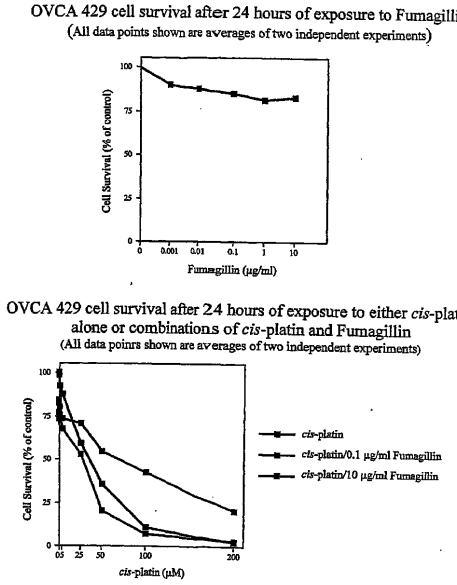
OVCA 429 cell survival after 24 hours of exposure to Fumagillin
(All data points shown are averages of two independent experiments)
Cell Survival (% of control)
Fumagillin (μg/ml)
OVCA 429 cell survival after 24 hours of exposure to either cis-platin alone or combinations of cis-platin and Fumagillin
(All data poinrs shown are averages of two independent experiments)
Cell Survival (% of control)
cis-platin (μM)
cis-platin
cis-platin/0.1 μg/ml Fumagillin
cis-platin/10 μg/ml Fumagillin

Figure 42

【図４３】

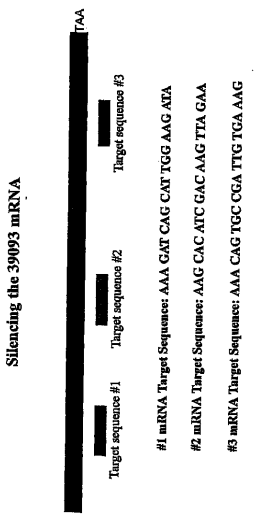
Silencing the 39093 mRNA
TAA
Target sequence #3
Target sequence #2
Target sequence #1
#1 mRNA Target Sequence: AAA GAT CAG CAT TGG AAG ATA
#2 mRNA Target Sequence: AAG CAC ATC GAC AAG TTA GAA
#3 mRNA Target Sequence: AAA CAG TGC CGA TTG TGA AAG

Figure 43

【図４４】

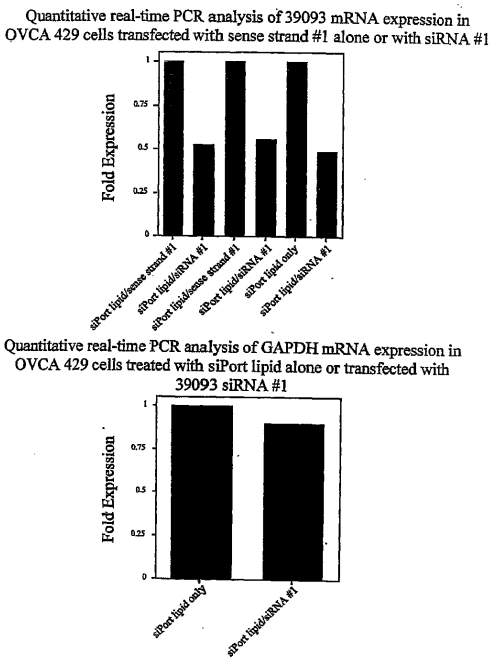
Quantitative real-time PCR analysis of 39093 mRNA expression in OVCA 429 cells transfected with sense strand #1 alone or with siRNA #1
Fold Expression
siPort lipid/sense strand #1
siPort lipid/siRNA #1
siPort lipid/sense strand #1
siPort lipid/siRNA #1
siPort lipid only
siPort lipid/siRNA #1
Quantitative real-time PCR analysis of GAPDH mRNA expression in OVCA 429 cells treated with siPort lipid alone or transfected with 39093 siRNA #1
Fold Expression
siPort lipid only
siPort lipid/siRNA #1

Figure 44

【図４５】

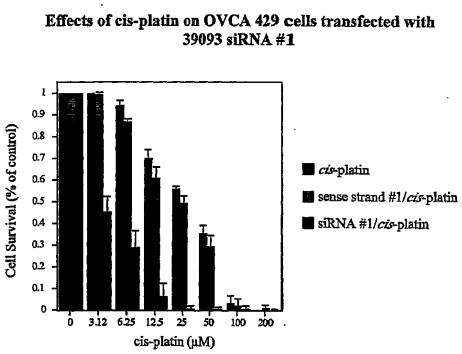
Effects of cis-platin on OVCA 429 cells transfected with 39093 siRNA #1
Cell Survival (% of control)
cis-platin (μM)
0 3.12 6.25 12.5 25 50 100 200
cis-platin
sense strand #1/cis-platin
siRNA #1/cis-platin

Figure 45

【図４６】

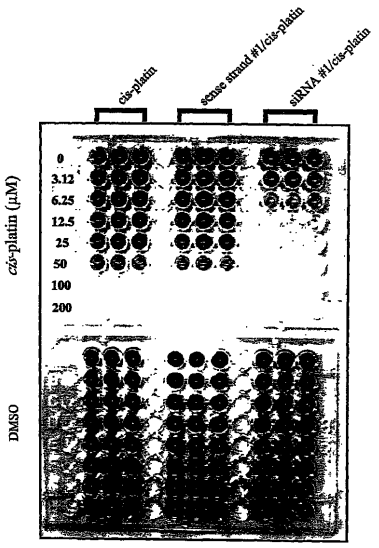

Figure 46

【図４７】

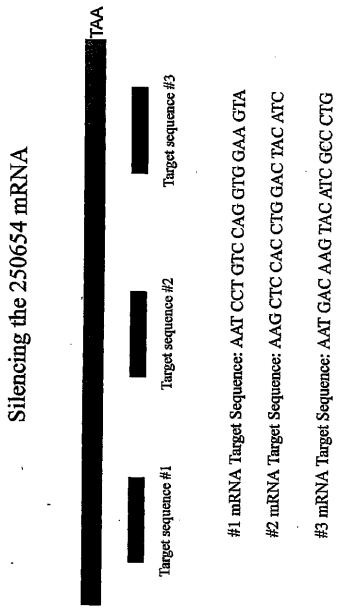
Silencing the 250654 mRNA
TAA
Target sequence #3
Target sequence #2
Target sequence #1
#1 mRNA Target Sequence: AAT CCT GTC CAG GTG GAA GTA
#2 mRNA Target Sequence: AAG CTC CAC CTG GAC TAC ATC
#3 mRNA Target Sequence: AAT GAC AAG TAC ATC GCC CTG

Figure 47

【図４８】

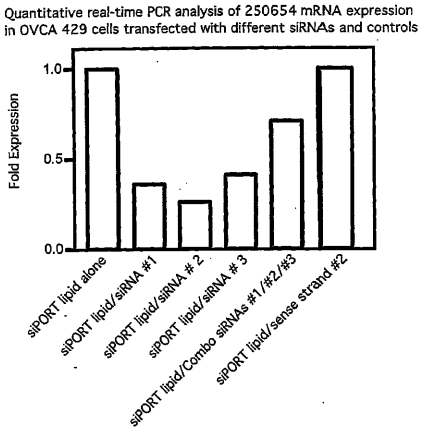
Quantitative real-time PCR analysis of 250654 mRNA expression in OVCA 429 cells transfected with different siRNAs and controls
Fold Expression
1.0
0.5
0.0
siPORT lipid alone
siPORT lipid/siRNA #1
siPORT lipid/siRNA # 2
siPORT lipid/siRNA # 3
siPORT lipid/Combo siRNAs #1/#2/#3
siPORT lipid/sense strand #2

Figure 48

【図４９】

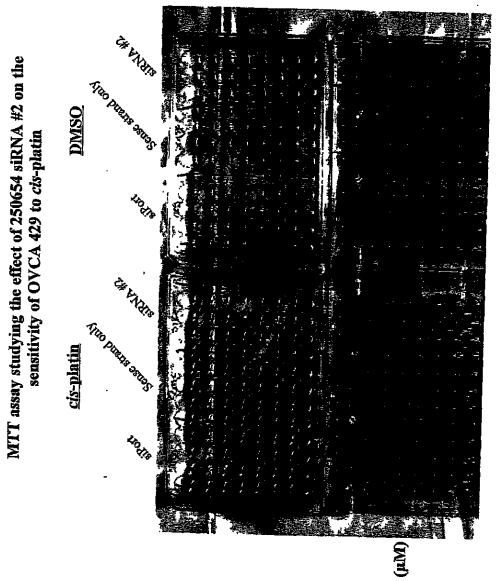

Figure 49

【図５０】

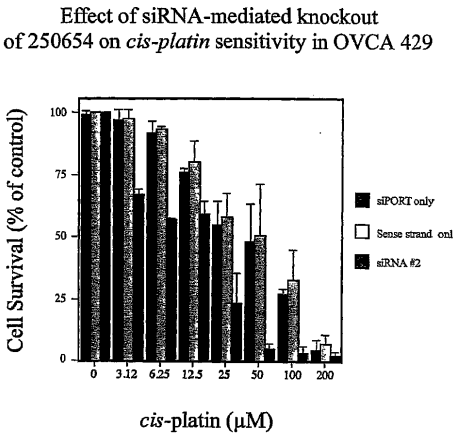

Figure 50

【図５１】

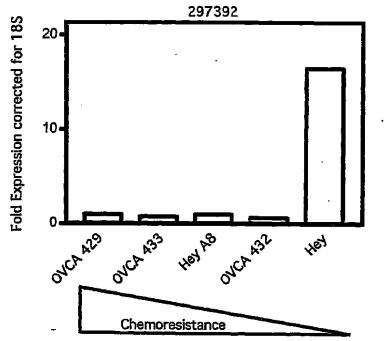

Figure 51

【図５２】

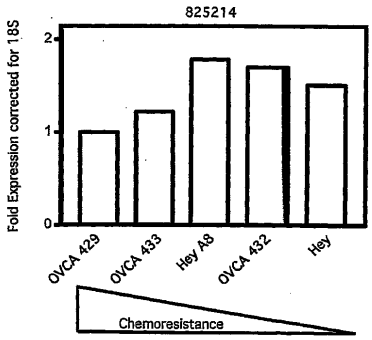

Figure 52

【図５３】

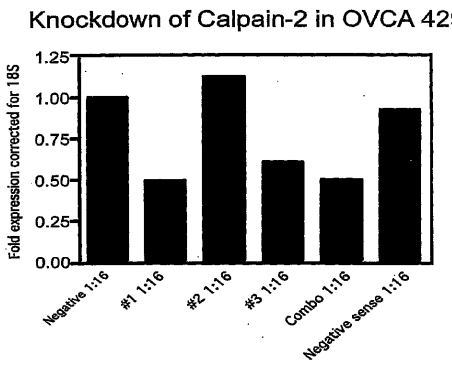

Figure 53

【図５４】

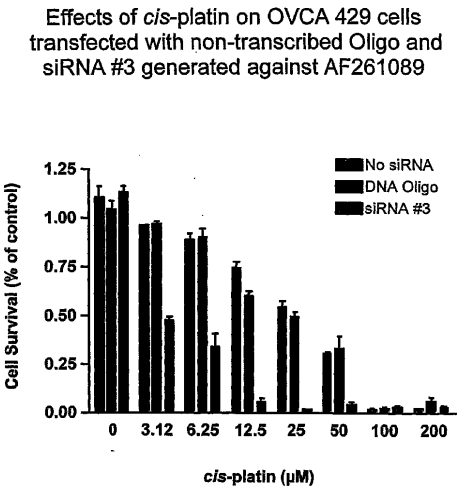

Figure 54

【図５５】

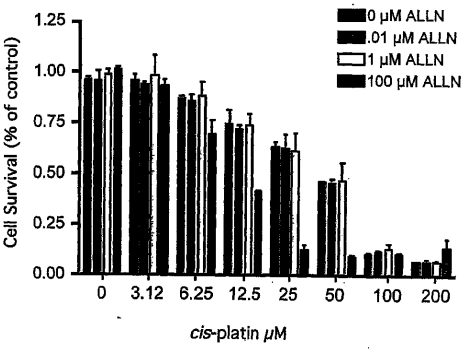

Figure 55

【図５６】

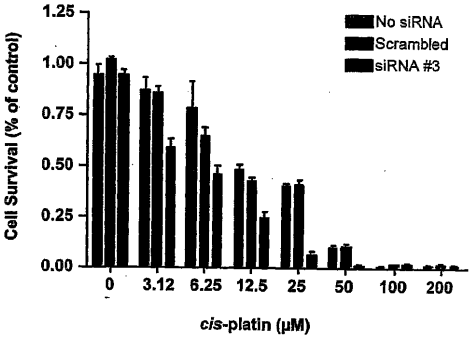

Figure 56

【図５７】

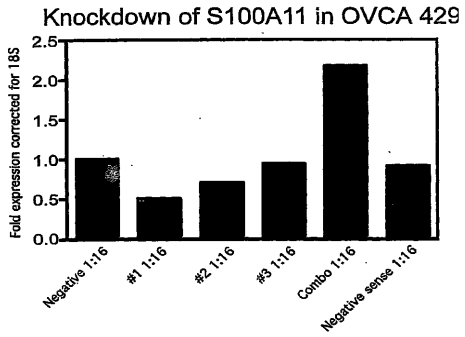

Figure 57

【図５８】

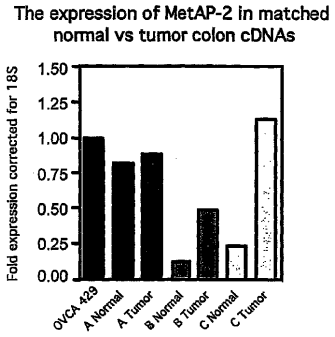

Figure 58

【図５９】

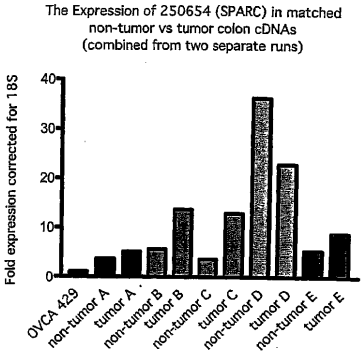

Figure 59

【図６０】

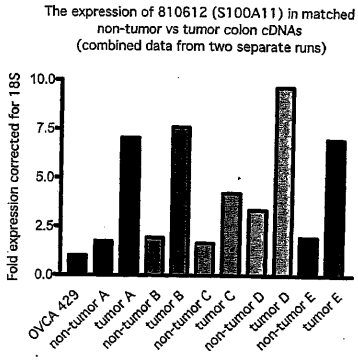

Figure 60

【図６１】

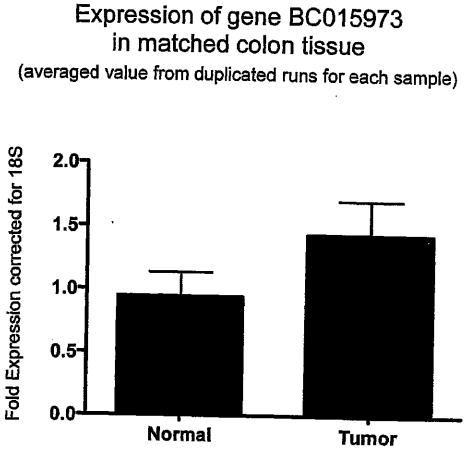

Figure 61

【図６２】

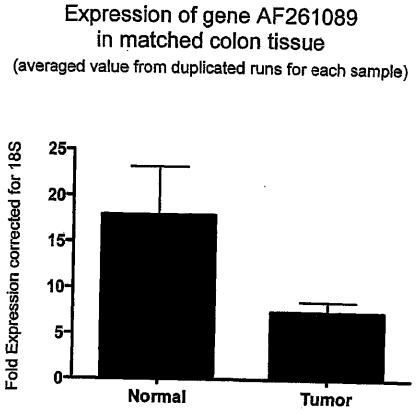

Figure 62

【図６３】

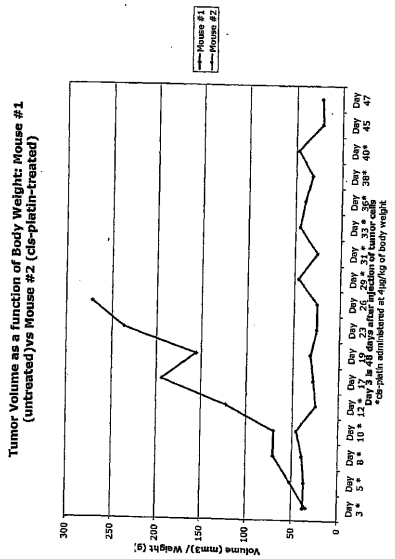

Figure 63

【図６４】

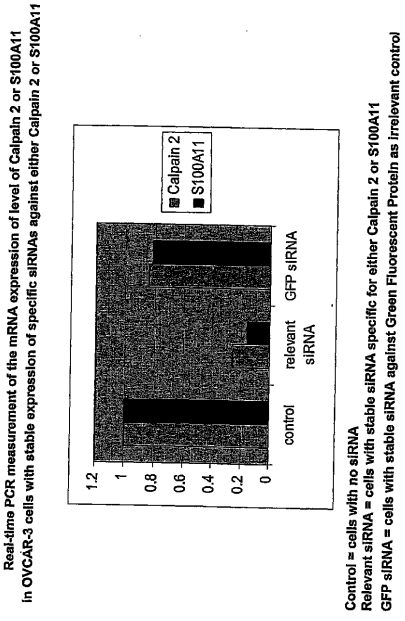
Real-time PCR measurement of the mRNA expression of level of Calpain 2 or S100A11
in OVCAR-3 cells with stable expression of specific siRNAs against either Calpain 2 or S100A11
Calpain 2
S100A11
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
control
relevant siRNA
GFP siRNA
Control = cells with no siRNA
Relevant siRNA = cells with stable siRNA specific for either Calpain 2 or S100A11
GFP siRNA = cells with stable siRNA against Green Fluorescent Protein as irrelevant control

Figure 64

【配列表】
2007517058000001.xml
【手続補正書】
【提出日】平成18年6月30日(2006.6.30)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
腫瘍細胞の化学療法薬抵抗性を低減させるための組成物であって、細胞遺伝子の少なくとも１種の修飾因子を含んでなり、該細胞遺伝子が、Ｓ１００Ａ１０、Ｓ１００Ａ１１、カルパイン２、ＳＰＡＲＣ、ＭｅｔＡＰ２、ＫＬＫ６、ＡＲＡ９、カルポニン２、ＲＮＰＳ１、ｅＩＦ５、ｅＩＦ２Ｂε、ＨＳＦ２、ＷＤＲ１、フューズドトウ（Ｆｕｓｅｄ ｔｏｅｓ）、ＮＭ２３Ｄ、ＡＤＡＲ１、グランカルシン、ＮＢＲ１、ＳＡＰＫ／Ｅｒｋ１、亜鉛フィンガータンパク質－２６２ＭＹＭ、ＨＹＡ２２、ＭＲＰＬ４、ビネキシンβ、Ｇ－ＣＳＦＲ、ＩＧＦＢＰ－７、ＦＡＳＴキナーゼ、ＴＥＳＫ２、ＳＲＢ１、ＫＩＡＡ００８２、ＭＰＰ１０、ＨＭＴ１、ＮＡＩＰ、ｅＥＦ１ε、ＲＡＢ２２Ａ、ＮＣＯＲ２、またはＭＴ１であり、該細胞が、修飾因子の不在下と比べて、修飾因子の存在下で化学療法薬に対する抵抗性がより低いことを特徴とする組成物。
【請求項２】
前記化学療法薬がシスプラチンである、請求項１に記載の組成物。
【請求項３】
前記修飾因子が阻害因子であり、前記遺伝子がＭｅｔＡＰ－２である、請求項１に記載の組成物。
【請求項４】
前記阻害因子がｓｉＲＮＡである、請求項３に記載の組成物。
【請求項５】
前記ｓｉＲＮＡが配列番号４、配列番号５、または配列番号６のものである、請求項４に記載の組成物。
【請求項６】
前記阻害因子がフマギリンまたはフマギリンの誘導体である、請求項３に記載の組成物。
【請求項７】
前記腫瘍細胞が卵巣がん腫瘍細胞である、請求項１に記載の組成物。
【請求項８】
前記修飾因子が阻害因子であり、前記遺伝子がＳＰＡＲＣである、請求項１に記載の組成物。
【請求項９】
前記阻害因子がｓｉＲＮＡである、請求項８に記載の組成物。
【請求項１０】
前記ｓｉＲＮＡが配列番号１、配列番号２、または配列番号３のものである、請求項９に記載の組成物。
【請求項１１】
前記修飾因子が阻害因子であり、前記遺伝子がカルパイン２である、請求項１に記載の組成物。
【請求項１２】
前記阻害因子がＡＬＬＮまたはＡＬＬＮの誘導体である、請求項１１に記載の組成物。
【請求項１３】

前記阻害因子がｓｉＲＮＡである、請求項１１に記載の組成物。
【請求項１４】
前記ｓｉＲＮＡが配列番号７、配列番号８、または配列番号９のものである、請求項１３に記載の組成物。
【請求項１５】
前記修飾因子が阻害因子であり、前記遺伝子がＳ１００Ａ１１である、請求項１に記載の組成物。
【請求項１６】
前記阻害因子がｓｉＲＮＡである、請求項１５に記載の組成物。
【請求項１７】
前記ｓｉＲＮＡが配列番号１０、配列番号１１、または配列番号１２のものである、請求項１６に記載の組成物。
【請求項１８】
前記修飾因子が阻害因子であり、前記遺伝子がＳ１００Ａ１０である、請求項１に記載の組成物。
【請求項１９】
前記阻害因子がｓｉＲＮＡである、請求項１８に記載の組成物。
【請求項２０】
前記ｓｉＲＮＡが配列番号５９、配列番号６０、または配列番号６１のものである、請求項１９に記載の組成物。
【請求項２１】
前記調節因子が阻害因子であり、前記遺伝子が、ＫＬＫ６、ＡＲＡ９、カルポニン２、ＲＮＰＳ１、ｅＩＦ５、ｅＩＦ２Ｂε、ＷＤＲ１、フューズドトウ（Ｆｕｓｅｄ ｔｏｅｓ）、ＮＭ２３Ｄ、グランカルシン、ＳＡＰＫ／Ｅｒｋ１、亜鉛フィンガータンパク質－２６２ＭＹＭ、ＨＹＡ２２、ビネキシンβ、Ｇ－ＣＳＦＲ、ＩＧＦＢＰ－７、ＳＲＢ１、またはＫＩＡＡ００８２である、請求項１に記載の組成物。
【請求項２２】
前記阻害因子がｓｉＲＮＡである、請求項２１に記載の組成物。
【請求項２３】
前記ｓｉＲＮＡが配列番号６４～１０８、または１３４～１４４のうちの任意のものである、請求項２２に記載の組成物。
【請求項２４】
腫瘍細胞の増殖を抑制するための組成物であって、細胞遺伝子の少なくとも１種の阻害因子を含んでなり、該細胞遺伝子が、ＳＰＡＲＣ、カルパイン２、Ｓ１００Ａ１０、Ｓ１００Ａ１１、ＭｅｔＡＰ２、ＫＬＫ６、ＡＲＡ９、カルポニン２、ＲＮＰＳ１、ｅＩＦ５、ｅＩＦ２Ｂε、ＷＤＲ１、フューズドトウ（Ｆｕｓｅｄ ｔｏｅｓ）、ＮＭ２３Ｄ、グランカルシン、ＳＡＰＫ／Ｅｒｋ１、亜鉛フィンガータンパク質－２６２ＭＹＭ、ＨＹＡ２２、ビネキシンβ、Ｇ－ＣＳＦＲ、ＩＧＦＢＰ－７、ＳＲＢ１、またはＫＩＡＡ００８２であることを特徴とする組成物。
【請求項２５】
プラチナ系の化学療法剤をさらに含んでなる、請求項２４に記載の組成物。
【請求項２６】
前記少なくとも１種の阻害因子がＭｅｔＡＰ－２活性の阻害因子である、請求項２４に記載の組成物。
【請求項２７】
前記少なくとも１種の阻害因子がフマギリンまたはフマギリンの誘導体である、請求項２６に記載の組成物。
【請求項２８】
前記腫瘍細胞が卵巣がん細胞である、請求項２４に記載の組成物。
【請求項２９】

前記阻害因子がｓｉＲＮＡである、請求項２４に記載の組成物。
【請求項３０】
前記ｓｉＲＮＡが、配列番号１、配列番号２、配列番号３、配列番号４、配列番号５、配列番号６、配列番号７、配列番号８、配列番号９、配列番号５９、配列番号６０、配列番号６１、または配列番号６４～１０８もしくは配列番号１３４～１４４のうちの任意のものとして特定される、請求項２９に記載の組成物。
【請求項３１】
卵巣がん患者の腫瘍が化学治療薬に対して抵抗性であるかどうかを予測する方法であって、
ａ．患者から採取された生物試料中の１または複数の発現遺伝子または該発現遺伝子によってコードされる遺伝子産物の量を検出する工程であって、該発現遺伝子がＳ１００Ａ１０、Ｓ１００Ａ１１、カルパイン２、ＳＰＡＲＣ、ＭｅｔＡＰ２、ＫＬＫ６、ＡＲＡ９、カルポニン２、ＲＮＰＳ１、ｅＩＦ５、ｅＩＦ２Ｂε、ＨＳＦ２、ＷＤＲ１、フューズドトウ（Ｆｕｓｅｄ　ｔｏｅｓ）、ＮＭ２３Ｄ、ＡＤＡＲ１、グランカルシン、ＮＢＲ１、ＳＡＰＫ／Ｅｒｋ１、亜鉛フィンガータンパク質－２６２ＭＹＭ、ＨＹＡ２２、ＭＲＰＬ４、ビネキシンβ、Ｇ－ＣＳＦＲ、ＩＧＦＢＰ－７、ＦＡＳＴキナーゼ、ＴＥＳＫ２、ＳＲＢ１、ＫＩＡＡ００８２、ＭＰＰ１０、ＨＭＴ１、ＮＡＩＰ、ｅＥＦ１ε、ＲＡＢ２２Ａ、ＮＣＯＲ２、またはＭＴ１である工程、
ｂ．対照試料中の１または複数の対応する発現遺伝子または該発現遺伝子によってコードされる遺伝子産物の量を検出する工程であって、該発現遺伝子がＳ１００Ａ１０、Ｓ１００Ａ１１、カルパイン２、ＳＰＡＲＣ、ＭｅｔＡＰ２、ＫＬＫ６、ＡＲＡ９、カルポニン２、ＲＮＰＳ１、ｅＩＦ５、ｅＩＦ２Ｂε、ＨＳＦ２、ＷＤＲ１、フューズドトウ（Ｆｕｓｅｄ　ｔｏｅｓ）、ＮＭ２３Ｄ、ＡＤＡＲ１、グランカルシン、ＮＢＲ１、ＳＡＰＫ／Ｅｒｋ１、亜鉛フィンガータンパク質－２６２ＭＹＭ、ＨＹＡ２２、ＭＲＰＬ４、ビネキシンβ、Ｇ－ＣＳＦＲ、ＩＧＦＢＰ－７、ＦＡＳＴキナーゼ、ＴＥＳＫ２、ＳＲＢ１、ＫＩＡＡ００８２、ＭＰＰ１０、ＨＭＴ１、ＮＡＩＰ、ｅＥＦ１ε、ＲＡＢ２２Ａ、ＮＣＯＲ２、またはＭＴ１である工程、ならびに
ｃ．工程（ａ）で検出される発現遺伝子または遺伝子産物の量を工程（ｂ）で検出される発現遺伝子または遺伝子産物の量と比較する工程
からなり、
工程（ａ）で検出される量が工程（ｂ）で検出される量と比べて少なくとも２０％異なる場合は、該患者が該化学治療薬に対して抵抗性であると予測される方法。
【請求項３２】
前記化学療法がプラチナ系の化学療法である、請求項３１に記載の方法。
【請求項３３】
前記発現遺伝子がＭｅｔＡＰ２またはＳＰＡＲＣである、請求項３１に記載の方法。
【請求項３４】
患者の卵巣がんの進行を観察するための方法であって、
ａ．患者から採取された生物試料中の１または複数の発現遺伝子または該発現遺伝子によってコードされる遺伝子産物の量を検出する工程であって、該発現遺伝子が、Ｓ１００Ａ１０、Ｓ１００Ａ１１、カルパイン２、ＳＰＡＲＣ、ＭｅｔＡＰ２、ＫＬＫ６、ＡＲＡ９、カルポニン２、ＲＮＰＳ１、ｅＩＦ５、ｅＩＦ２Ｂε、ＨＳＦ２、ＷＤＲ１、フューズドトウ（Ｆｕｓｅｄ　ｔｏｅｓ）、ＮＭ２３Ｄ、ＡＤＡＲ１、グランカルシン、ＮＢＲ１、ＳＡＰＫ／Ｅｒｋ１、亜鉛フィンガータンパク質－２６２ＭＹＭ、ＨＹＡ２２、ＭＲＰＬ４、ビネキシンβ、Ｇ－ＣＳＦＲ、ＩＧＦＢＰ－７、ＦＡＳＴキナーゼ、ＴＥＳＫ２、ＳＲＢ１、ＫＩＡＡ００８２、ＭＰＰ１０、ＨＭＴ１、ＮＡＩＰ、ｅＥＦ１ε、ＲＡＢ２２Ａ、ＮＣＯＲ２、またはＭＴ１である工程、
ｂ．その後の採取により該患者から得られた生物試料を用いて工程（ａ）を繰り返す工程、ならびに
ｃ．工程（ａ）で検出される発現遺伝子または遺伝子産物の量を工程（ｂ）で検出され

る発現遺伝子または遺伝子産物の量と比較する工程であって、工程（ｂ）で検出される量が、
ｉ．Ｓ１００Ａ１０、Ｓ１００Ａ１１、カルパイン２、ＳＰＡＲＣ、ＭｅｔＡＰ２、ＫＬＫ６、ＡＲＡ９、カルポニン２、ＲＮＰＳ１、Ｅｉｆ５、Ｅｉｆ２Ｂε、ＨＳＦ２、ＷＤＲ１、フューズドトウ（Ｆｕｓｅｄ　ｔｏｅｓ）、ＮＭ２３Ｄ、ＡＤＡＲ１、グランカルシン、ＮＢＲ１、ＳＡＰＫ／Ｅｒｋ１、亜鉛フィンガータンパク質－２６２ＭＹＭ、ＨＹＡ２２、ＭＲＰＬ４、ビネキシンβ、Ｇ－ＣＳＦＲ、ＩＧＦＢＰ－７、ＦＡＳＴキナーゼ、ＴＥＳＫ２、ＳＲＢ１、またはＫＩＡＡ００８２については、工程（ａ）で検出された量以上であるとき、および、
ｉｉ．ＭＰＰ１０、ＨＭＴ１、ＮＡＩＰ、Ｅｅｆ１ε、ＲＡＢ２２Ａ、ＮＣＯＲ２、またはＭＴ１については、工程（ａ）で検出された量以下であるとき
にがんが進行していることを特徴とする工程
からなる方法。
【請求項３５】
前記発現遺伝子がＥｉｆ５またはＳＰＡＲＣである、請求項３４に記載の方法。
【請求項３６】
化学療法抵抗性の腫瘍細胞の薬物抵抗性を低減させる化合物を同定する方法であって、
ａ．化学療法抵抗性の卵巣がん細胞で過剰発現される遺伝子を発現する細胞を、該細胞が抵抗性を有する濃度の化学療法薬とともに試験化合物に接触させる工程であって、該遺伝子が、Ｓ１００Ａ１０、Ｓ１００Ａ１１、カルパイン２、ＳＰＡＲＣ、ＭｅｔＡＰ２、ＫＬＫ６、ＡＲＡ９、カルポニン２、ＲＮＰＳ１、Ｅｉｆ５、Ｅｉｆ２Ｂε、ＨＳＦ２、ＷＤＲ１、フューズドトウ（Ｆｕｓｅｄ　ｔｏｅｓ）、ＮＭ２３Ｄ、ＡＤＡＲ１、グランカルシン、ＮＢＲ１、ＳＡＰＫ／Ｅｒｋ１、亜鉛フィンガータンパク質－２６２ＭＹＭ、ＨＹＡ２２、ＭＲＰＬ４、ビネキシンβ、Ｇ－ＣＳＦＲ、ＩＧＦＢＰ－７、ＦＡＳＴキナーゼ、ＴＥＳＫ２、ＳＲＢ１、またはＫＩＡＡ００８２である工程、
ｂ．該試験化合物の存在下および不在下での該遺伝子の発現を検出する工程、ならびに
ｃ．該試験化合物の存在下および不在下での該遺伝子の発現を比較する工程であって、該試験化合物の存在下での該遺伝子の発現が、該試験化合物の不在下での該遺伝子の発現と比べて低減されており、かつ、腫瘍細胞増殖が該化合物の存在下で低減されている場合、化合物が、化学療法抵抗性の腫瘍細胞増殖を抑制する化合物として同定されることを特徴とする工程
からなる方法。
【請求項３７】
化学療法抵抗性の腫瘍細胞の薬物抵抗性を低減させる化合物を同定する方法であって、
ａ．試験化合物を用いて、化学療法抵抗性の卵巣がん細胞で通常レベルより低いレベルで発現される遺伝子を発現する細胞を、該細胞が抵抗性を有する濃度の化学療法薬とともに試験化合物に接触させる工程であって、該遺伝子が、ＨＭＴ１、ＮＡＩＰ、Ｅｅｆ１ε、ＲＡＢ２２Ａ、ＮＣＯＲ２、ＭＴ１、またはＭＰＰ１０である工程、
ｂ．該試験化合物の存在下および不在下での該遺伝子の発現を検出する工程、ならびに
ｃ．該試験化合物の存在下および不在下での該遺伝子の発現を比較する工程であって、該試験化合物の存在下での該遺伝子の発現が、該試験化合物の不在下での該遺伝子の発現と比べて増大されており、かつ、腫瘍細胞増殖が該化合物の存在下で低減されている場合、化合物が、化学療法抵抗性の腫瘍細胞増殖を抑制する化合物として同定されることを特徴とする工程
からなる方法。
【請求項３８】
患者のがんを治療するための薬剤としての、薬剤組成物の有効性を観察する方法であって、
ａ．患者から採取された生物試料中の１または複数の発現遺伝子または該発現遺伝子によってコードされる遺伝子産物の量を検出する工程であって、該発現遺伝子が、Ｓ１００

Ａ１０、Ｓ１００Ａ１１、カルパイン２、ＳＰＡＲＣ、ＭｅｔＡＰ２、ＫＬＫ６、ＡＲＡ９、カルポニン２、ＲＮＰＳ１、Ｅｉｆ５、Ｅｉｆ２Ｂε、ＨＳＦ２、ＷＤＲ１、フューズドトウ（Ｆｕｓｅｄ　ｔｏｅｓ）、ＮＭ２３Ｄ、ＡＤＡＲ１、グランカルシン、ＮＢＲ１、ＳＡＰＫ／Ｅｒｋ１、亜鉛フィンガータンパク質－２６２ＭＹＭ、ＨＹＡ２２、ＭＲＰＬ４、ビネキシンβ、Ｇ－ＣＳＦＲ、ＩＧＦＢＰ－７、ＦＡＳＴキナーゼ、ＴＥＳＫ２、ＳＲＢ１、ＫＩＡＡ００８２、またはＭＰＰ１０、ＨＭＴ１、ＮＡＩＰ、ＥｅＦ１ε、ＲＡＢ２２Ａ、ＮＣＯＲ２、ＭＴ１である工程、

ｂ．ある量の薬剤組成物を該患者に投与する工程、

ｃ．その後の採取により該患者から得られた生物試料を用いて工程（ａ）を繰り返す工程、ならびに

ｄ．工程（ａ）で検出される発現遺伝子または遺伝子産物の量を工程（ｃ）で検出される発現遺伝子または遺伝子産物の量と比較する工程であって、工程（ａ）で採取された生物試料に対する、その後に採取された生物試料中の発現遺伝子または遺伝子産物の量の変化を検出することによって該薬剤組成物の有効性を観察し、かつ、該組成物の存在下で腫瘍細胞増殖が低減されていることを特徴とする工程

からなる方法。

【請求項３９】

結腸がんを検出する方法であって、

ａ．患者から生物試料を得る工程、

ｂ．該生物試料中の１または複数の発現遺伝子または該発現遺伝子によってコードされる遺伝子産物の量を検出する工程であって、該発現遺伝子がＳ１００Ａ１０、Ｓ１００Ａ１１、カルパイン２、ＳＰＡＲＣ、またはＭｅｔＡＰ２である工程、

ｃ．対照試料中で検出される１または複数の発現遺伝子または遺伝子産物の量を検出する工程、

ｄ．工程（ｂ）から得られる１または複数の発現遺伝子または遺伝子産物の量を工程（ｃ）での量と比較する工程

からなり、

工程（ｂ）で検出される１または複数の遺伝子の量が、工程（ｃ）で検出される１または複数の遺伝子の量と異なる場合に結腸がんが検出されることを特徴とする方法。

【請求項４０】

工程（ｂ）のＳ１００Ａ１０、Ｓ１００Ａ１１、ＳＰＡＲＣ、またはＭｅｔＡＰ２の量が、工程（ｃ）での量と比べて増加している場合に結腸がんが検出される、請求項３９に記載の方法。

【請求項４１】

工程（ｂ）のカルパイン２の量が、工程（ｃ）での量と比べて減少している場合に結腸がんが検出される、請求項３９に記載の方法。

【請求項４２】

前記修飾因子がｓｉＲＮＡまたはｓｈＲＮＡである、請求項１に記載の組成物。

【請求項４３】

前記修飾因子が１９、２０、または２１ヌクレオチド長のｓｉＲＮＡである、請求項４２に記載の組成物。

【請求項４４】

前記修飾因子が１９、２０、または２１ヌクレオチド長のアームを有するヘアピンループを形成するｓｈＲＮＡである、請求項４２に記載の組成物。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte ll Application No
PC.,..2004/043837

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12Q1/68 A61K31/7105

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12Q A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, EMBL, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01/12781 A (HUMAN GENOME SCIENCES, INC; BIRSE, CHARLES, E; ROSEN, CRAIG, A) 22 February 2001 (2001-02-22)	1,2,7, 18,24, 25,28, 34, 38-40, 42,44
Y	page 13 - page 16; sequence 13 page 227, line 26 - page 228, line 7	19,20, 29,30,43
	-/--	

[X] Further documents are listed in the continuation of box C. [X] Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
'E' earlier document but published on or after the international filing date
'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
'&' document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
29 July 2005	02. 11. 2005

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Schwachtgen, J-L

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2004)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inten il Application No
PCT/US2004/043837

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MOLER E J ET AL: "Analysis of molecular profile data using generative and discriminative methods" PHYSIOLOGICAL GENOMICS, vol. 4, February 2001 (2001-02), pages 109-126, XP002338419 ISSN: 1094-8341 page 110, column 1, paragraph 3 tables 2,6 page 124, column 1, paragraph 1	39,40
Y	LU PATRICK Y ET AL: "siRNA-mediated antitumorigenesis for drug target validation and therapeutics." CURRENT OPINION IN MOLECULAR THERAPEUTICS. JUN 2003, vol. 5, no. 3, June 2003 (2003-06), pages 225-234, XP009037747 ISSN: 1464-8431 the whole document	19,20, 29,30,43
A	WO 03/039327 A (DANA-FARBER CANCER INSTITUTE; OREGON HEALTH AND SCIENCE UNIVERSITY; D') 15 May 2003 (2003-05-15) the whole document	1,2,7, 18-20, 24,25, 28-32, 34,36, 38-40, 42-44
A	WO 02/14554 A (CITY OF HOPE) 21 February 2002 (2002-02-21) claims 1-93	1,2,7, 18-20, 24,25, 28-32, 34,36, 38-40, 42-44

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (January 2004)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

tional application No.
PCT/US2004/043837

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. [X] Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

2. [ ] Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:

3. [ ] Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. [ ] As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. [ ] As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. [ ] As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. [X] No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

18-20 (completely); 1,2,7,24,25,28-32,34,36,38-40,42-44 (partially)

Remark on Protest

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

[ ] No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2004/043837

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

Invention 1: Claims 18-20 (completely); 1,2, 7, 24, 25, 28-32, 34, 36, 38-40, 42-44 (partially)

methods of diagnosis and treatment of cancer using chemoresistance target gene S100A10

Invention 2: Claims 15-17 (completely); 1,2, 7, 24, 25, 28, 29, 31, 32, 34, 36, 38-40, 42-44 (partially)

methods of diagnosis and treatment of cancer using chemoresistance target gene S100A11

Invention 3: Claims 11-14, 41 (completely); 1,2, 7, 24, 25, 28-32, 34, 36, 38-40, 42-44 (partially)

methods of diagnosis and treatment of cancer using chemoresistance target gene Calpain 2

Invention 4: Claims 8-10 (completely); 1,2, 7, 24, 25, 28-36, 38-40, 42-44 (partially)

methods of diagnosis and treatment of cancer using chemoresistance target gene SPARC

Invention 5: Claims3-6, 26, 27 (completely); 1,2, 7, 24, 25, 28, 29, 31-34, 36, 38-40, 42-44 (partially)

methods of diagnosis and treatment of cancer using chemoresistance target gene MetAP2

Inventions 6-9: Claims 1,2, 7, 21-25, 28-32, 34, 36, 38, 42-44 (partially)

methods of diagnosis and treatment of cancer using each of the chemoresistance target genes KLK6, ARA9, Calponin 2, RNPS1, respectively

---

Invention 10: Claims 1,2, 7, 21-25, 28-32, 34-36, 38, 42-44 (partially)

methods of diagnosis and treatment of cancer using chemoresistance target gene eIF5

Inventions 11-29: Claims 1,2, 7, 21-25, 28-32, 34, 36, 38, 42-44 (partially)

International Application No. PCT/US2004/043837

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

methods of diagnosis and treatment of cancer using each of the chemoresistance target genes eIF2BE, HSF2, WDRI, Fused toes, NM23D, ADAR1, Grancalcin, NBR1, SAPKJErk1, zinc finger protein-262 MYM, HYA22, MRPL4, Vinexin I, G-CSFR, IGFBP-7, FAST kinase, TESK2, SRB1, KIAA0082, respectively

---

Inventions 30-36: Claims 1,2, 7, 31, 32, 37, 38, 42-44 (partially)

methods of diagnosis and treatment of cancer using each of the chemoresistance target genes MPP10, HMT1, NAIP, eEFIE, RAB22A, NCOR2 or MTI, respectively

---

International Application No. PCT/US2004/043837

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.1

Although claims 1-30, 42-44 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
Although claims 31-35, 38-41 are directed to a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

ormation on patent family members

Intern al Application No
PCT/US2004/043837

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 0112781	A	22-02-2001	AU	7058000 A	13-03-2001
			CA	2385487 A1	22-02-2001
			EP	1208191 A1	29-05-2002
			JP	2003507033 T	25-02-2003
WO 03039327	A	15-05-2003	CA	2465949 A1	15-05-2003
			EP	1451343 A2	01-09-2004
WO 0214554	A	21-02-2002	AU	8123201 A	25-02-2002
			CA	2418320 A1	21-02-2002
			EP	1356097 A2	29-10-2003
			JP	2004506430 T	04-03-2004

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (January 2004)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
A61K	***31/7105***	***(2006.01)***	A61K	31/7105		
A61K	***48/00***	***(2006.01)***	A61K	48/00		
A61K	***38/00***	***(2006.01)***	A61K	37/02		
A61P	***15/00***	***(2006.01)***	A61P	15/00		
A61P	***1/00***	***(2006.01)***	A61P	1/00		
A61P	***43/00***	***(2006.01)***	A61P	43/00	121	
A61K	***31/336***	***(2006.01)***	A61K	31/336		
A61K	***31/711***	***(2006.01)***	A61K	31/711		
A61K	***31/282***	***(2006.01)***	A61K	31/282		
C12N	*15/09*	*(2006.01)*	C12N	15/00	A	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,MC,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NA,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

Fターム(参考)
4B024 AA01 AA11 BA80 CA01 CA05 CA09 CA11 CA20 HA12
4B063 QA01 QA13 QA18 QA19 QQ08 QQ42 QQ52 QR32 QR35 QR55 QR62 QR82 QS25 QS32 QX02
4C084 AA02 AA13 AA17 BA01 BA08 BA14 BA31 CA59 DA27 MA02 NA05 ZA66 ZA81 ZB26 ZC41 ZC75
4C086 AA01 AA02 BA02 HA12 HA24 HA26 HA28 MA01 MA04 NA05 ZA66 ZA81 ZB26 ZC41 ZC75
4C206 AA01 AA02 JB13 JB17 MA01 MA04 NA05 ZA66 ZA81 ZB26